

Genetische Charakterisierung chromosomaler Bruchpunkte

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
von**

**Dipl.-Biol. Anita Heller
geboren am 07.05.1973 in Schmalkalden**

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ZYTOGENETIK	2
1.1.1	Klassische Zytogenetik	2
1.1.2	Bänderungs-Zytogenetik	2
1.1.3	Molekulare Zytogenetik	3
1.1.3.1	Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	3
1.1.3.2	Gebräuchliche Sonden in der FISH	4
1.1.3.3	Von der Ein- zur Vielfarben-FISH	5
1.1.3.4	FISH-Bänderungs-Methoden	6
1.1.3.5	Weitere Methoden der molekularen Zytogenetik	7
1.2	BRUCHPUNKTE	8
1.2.1	Chromosomale Bruchpunkte	8
1.2.2	Molekulargenetische Bruchpunkte	9
1.2.3	Mögliche Auswirkungen von Brüchen auf Proteinebene	9
1.3	FRAGESTELLUNG	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	12
2.1.1	Chromosomenpräparation	12
2.1.1.1	Chromosomenpräparation aus Blut	12
2.1.1.2	Chromosomenpräparation aus Knochenmark	13
2.1.1.3	Chromosomenpräparation aus Amnionzellen	13
2.1.1.4	Chromosomenpräparation der GGO- und HLA-Zelllinien	15
2.1.2	Herstellung von Objektträger-Präparaten für konventionelle zytogenetische Methoden und FISH	15
2.2	VERWENDETE DNA-SONDEN	15
2.2.1	YAC-, BAC-Sonden und Plasmide	15
2.2.2	Durch Mikrosezierung hergestellte DNA-Sonden	17
2.2.3	Zentromerspezifische Sonden	18
2.2.4	Weitere Lokusspezifische Sonden	18
2.2.5	Verwendete Sondenmixe	18
2.3	MIKROSEZIERUNG VON CHROMOSOMEN BZW. KERNEN (<i>MICRO-CGH</i>)	18
2.3.1	Verwendete Lösungen und Materialien	18
2.3.2	Durchführung der Chromosomen-Mikrosezierung	20
2.3.3	Sammeln von Kernen für <i>Micro-CGH</i>	21
2.4	MOLEKULARGENETISCHE TECHNIKEN	23
2.4.1	Präparation von Plasmid-DNA	23
2.4.2	c-DNA Synthese	23
2.4.2.1	Isolierung von RNA aus fixierten Knochenmarkzellen	23
2.4.2.2	Reverse-Transkriptase-Reaktion	23
2.4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.4.3.1	DOP-PCR	24
2.4.3.1.1	DNA-Amplifikation der mikrosezierten Chromosomenfragmente	25
2.4.3.1.2	DNA-Amplifikation der mikrosezierten Kerne	27
2.4.3.1.3	DNA-Amplifikation der YAC- und Plasmid-Sonden	27
2.4.3.1.4	Reamplifizierungs-PCR	27
2.4.3.1.5	Markierungs-PCR	28
2.4.3.2	Spezifische PCR	29
2.4.4	Nick-Translation zum Einbringen von markierten Nukleotiden	30
2.4.5	DNA-Sequenzierung	30
2.5	KLASSISCHE METHODEN DER BÄNDERUNGS-ZYTOGENETIK	32
2.5.1	GTG-Bandentechnik	32
2.5.2	CBG-Färbung	32
2.5.3	NOR-Färbung	33

2.6	MOLEKULARZYTOMETISCHE TECHNIKEN	33
2.6.1	DNA-Fällung der Sonden	33
2.6.2	Lösungen und verwendete Detektionssysteme	34
2.6.3	Hybridisierung	35
2.6.3.1	Objektträger-Vorbehandlung und Denaturierung	35
2.6.3.2	Präparation und Denaturierung der DNA-Sonden	36
2.6.3.3	Aufbringen der DNA-Sonden auf den Objektträger	38
2.6.4	Detektion	38
2.6.5	Auswertung	38
3	ERGEBNISSE	40
3.1	ETABLIERUNG NEUER MOLEKULARZYTOMETISCHER TECHNIKEN	40
3.1.1	Multicolor-Bänderung der Chromosomen 2, 13 und 22 mit einem auf YAC- und BAC-Banken basierendem Sondenmix (YAC/BAC-MCB)	40
3.1.2	Der etablierte, auf YAC-Klonen basierende <i>Chromosome-bar-code</i> für Chromosom 13	43
3.1.3	Multicolor-Bänderung (MCB) für alle menschlichen Chromosomen basierend auf Mikrosezierungsbanken	44
3.2	EVALUIERUNG DER MCB-METHODE	46
3.2.1	Charakterisierung der Bruchpunkte von konstitutionellen und tumorspezifischen Chromosomenaberrationen	46
3.2.2	Nachweis chromosomaler Umbauten in ZOO-FISH-Studien	54
3.2.2.1	Darstellung der Homologie der <i>Gorilla gorilla</i> (GGO)-Chromosomen im Vergleich zu <i>Homo sapiens</i> (HSA)	54
3.2.2.2	Darstellung der Homologie der <i>Hylobates lar</i> (HLA)-Chromosomen im Vergleich zu <i>Homo sapiens</i> (HSA)	58
3.3	CHARAKTERISIERUNG CHROMOSOMALER VERÄNDERUNGEN DURCH MCB-ANALYSEN	61
3.3.1	MCB bestätigt Bruchpunkte der GTG-Bänderung	61
3.3.2	Bruchpunktkorrektur nach Anwendung von MCB	62
3.3.2.1	Konstitutionelle Aberrationen	62
3.3.2.2	Tumorspezifische Aberrationen	65
3.3.3	Fälle mit einer Trisomie 8 lassen mittels MCB für Chromosom 8 keine Aberration erkennen	69
3.4	EINGRENZUNG DER BRUCHREGIONEN EINER T(16;21) MITTELS MCB UND NACHWEIS EINER FUS/ERG-GENFUSION	70
3.5	GRENZEN DER MCB-METHODE	72
3.5.1	Nicht eindeutig charakterisierbare Fälle	72
3.5.2	Robertsonische Translokationen lassen durch FISH mit spezifischen Sonden der acro-p11-Region konservierte Bruchpunkte erkennen	73
3.6	DURCH MCB SICHTBARE UNTERSCHIEDE IN DER BRUCHPUNKTVERTEILUNG BEI KONSTITUTIONELLEN UND TUMORSPEZIFISCHEN ABERRATIONEN	74
4	DISKUSSION	76
4.1	MULTICOLOR-BÄNDERUNGSTECHNIKEN	76
4.1.1	Eigenschaften des auf Mikrosezierungssonden basierenden MCBs	76
4.1.2	Evaluierung der MCB-Methode	77
4.1.3	Vergleich YAC/BAC-MCB zu MCB basierend auf Mikrosezierungssonden	79
4.1.4	Derzeit verfügbare FISH-Bänderungsmethoden	80
4.2	CHARAKTERISIERUNG VON BRUCHPUNKTEN KONSTITUTIONELLER UND TUMOR-SPEZIFISCHER ABERRATIONEN	83
4.2.1	Bruchpunktpräzisierung bei konstitutionellen Aberrationen	83
4.2.2	Bruchpunktpräzisierung tumorspezifischer Aberrationen	84
4.2.2.1	Einfache und komplexe Rearrangements	84
4.2.2.2	Molekulargenetische Bruchpunktanalyse einer t(16;21)	87
4.2.2.3	Potentiell kryptische 8er Chromosomenaberrationen	88

4.3	VERGLEICHENDE BETRACHTUNG DER BRUCHPUNKTE KONSTITUTIONELLER UND TUMORSPEZIFISCHER ABERRATIONEN -----	89
4.4	HÄUFIGE ROBERTSONSCHE TRANSLOKATIONEN UND DIE BEDEUTUNG KONSERVIERTER BRUCHPUNKTREGIONEN -----	91
4.5	ZOO-FISH-ANALYSEN -----	92
4.5.1	<i>Gorilla gorilla</i> -----	93
4.5.2	<i>Hylobates lar</i> -----	93
4.6	MECHANISMEN ZUR ENTSTEHUNG CHROMOSOMALER REARRANGEMENTS -----	95
4.7	AUSBlicKE -----	95
5	ZUSAMMENFASSUNG -----	97
6	LITERATURVERZEICHNIS -----	I
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -----	XVI
8	ANHANG	
9	LEBENS LAUF	
10	PUBLIKATIONS LISTE	
11	DANKSAGUNG	
12	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	

1 Einleitung

Die Identifizierung chromosomaler Veränderungen und die Charakterisierung von Chromosomenbruchpunkten sind wichtige Bestandteile der zytogenetischen Diagnostik. Angeborene (konstitutionelle) oder erworbene Chromosomenaberrationen (meist in Zusammenhang mit malignen Neoplasien) werden dabei unterschieden. Insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen kommt der zytogenetischen Analyse von Knochenmark- und peripheren Blutzellen große Bedeutung zu, da vielfach bestimmte Erkrankungen mit spezifischen Chromosomenaberrationen einhergehen. Der Nachweis einer Aberration und die Identifizierung der involvierten Bruchpunkte können eine Einordnung der Erkrankung in eine bestimmte klinische Entität sowie die Abschätzung der Prognose und vielfach eine risikoadaptierte Behandlungsstrategie ermöglichen. Bei konstitutionellen chromosomalen Veränderungen ist eine Korrelation chromosomaler Aberrationen und deren Bruchpunkte zum klinischen Erscheinungsbild ebenfalls relevant, z. B. für Aussagen zur Diagnose, Prognose und Risikoabschätzung für Nachkommen.

Die Giemsa-Bänderung (Seabright, 1971) – eine Methode der zytogenetischen Routinediagnostik – beruht auf einer Anfärbung chromosomaler Proteine (Verma und Babu, 1994) und erzeugt auf diese Weise eine für jedes Chromosom charakteristische Schwarz-Weiß-Bandenabfolge. Chromosomale Rearrangements und die daran beteiligten Bruchpunkte können dann beschrieben werden, wenn eine Veränderung dieser Bandenabfolge sichtbar wird. Nicht in jedem Fall ist es jedoch möglich, eindeutige Aussagen zur Lage der jeweiligen Bruchpunkte zu treffen, wie Abbildung 1.1 verdeutlicht:

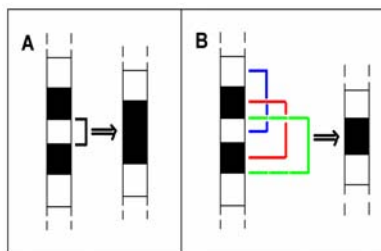


Abb. 1.1

Schwierigkeiten der Bruchpunktllokalisierung anhand konventionell gebänderter Chromosomen

Links sind jeweils schematisch Ausschnitte eines Giemsa-gebänderten normalen Chromosoms abgebildet, rechts sind die durch eine Deletion resultierenden aberranten Chromosomen skizziert.

(A) Eine Deletion (symbolisiert durch die schwarze Klammer) führt zu einem aberranten Chromosom. Die Bruchpunkte können dabei relativ

genau beschrieben werden. (B) Durch verschiedenfarbige Klammern sind unterschiedliche Deletionen charakterisiert, die alle zu einem in der Bandenabfolge identischem Chromosom führen. Aussagen zu den involvierten Bruchpunkten sind nur mit z. T. großer Ungenauigkeit möglich.

Ziel dieser Arbeit war es nun, chromosomale Bruchpunkte mit einer höheren Genauigkeit - als bisher erreichbar - zu charakterisieren.

Dazu war es notwendig, die Ungenauigkeiten der Protein-vermittelten Bänderung zu überwinden. Die Entwicklung einer geeigneten DNA-basierenden Bänderungsmethode der Chromosomen bot sich an. Sie sollte eine klare Unterscheidung chromosomaler Sub-Banden ermöglichen und eine Differenzierung des gesamten Aberrationsspektrums, wie Translokationen, Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Insertionen, erlauben. Nach Evaluierung dieser Methode wurde die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens anhand von Fällen mit konstitutionellen und erworbenen chromosomalen Veränderungen untersucht.

Mit Hilfe differenzierter molekularzytogenetischer Verfahren konnte gezeigt werden, daß (1.) sowohl in Fällen mit konstitutionellen als auch mit tumorspezifischen Veränderungen wesentliche Korrekturen der nach Giemsa-Bänderung beschriebenen Bruchpunkte vorgenommen werden mußten. Eine Korrektur der Bruchpunkte ließ (2.) in vielen Fällen eine Korrelation zu den bestehenden klinischen Auffälligkeiten zu. Ferner wurde geprüft, ob die Analyse von Tumorchromosomen (3.) eine Beschreibung neuer Bruchpunkte, die in Verbindung mit der Karzinogenese oder Karyotypevolution stehen könnten, erlaubt. Es konnte (4.) exemplarisch gezeigt werden, daß nach der Charakterisierung chromosomaler Bruchpunkte eine weiterführende molekulargenetische Analyse bis auf Genebene und der Nachweis einer Genfusion möglich ist.

Es wurde (5.) bei bestimmten Formen der Robertsonschen Translokationen eine Eingrenzung der chromosomalen Bruchpunktregion erreicht, welche Hinweise auf die diesen Aberrationen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen lieferte.

1.1 Zytogenetik

Die Geschichte der menschlichen Zytogenetik (= Chromosomenforschung) kann in 3 Epochen eingeteilt werden:

- ⇒ die Ära vor der ersten Chromosomenbänderung von 1879 bis 1968
- ⇒ die Ära der Chromosomenbänderungen von 1968 bis 1986
- ⇒ die Ära der molekularen Zytogenetik seit 1986.

1.1.1 Klassische Zytogenetik

1879 beschrieb Arnold erstmals menschliche Chromosomen, die er mit Hilfe des Lichtmikroskops gesehen hatte. Der Begriff „Chromosom“ (*chroma* = Farbe und *soma* = Körper) wurde im Jahre 1888 eingeführt (Waldeyer, 1888). In dem Artikel „*The chromosome inheritance*“ bezeichnete Sutton zeitgleich mit Boveri („*Ergebnis über die Konstitution der charakteristischen Substanz der Zellkerne*“, 1903) die Chromosomen als die Träger der Erbanlagen. Erste DNA-Strukturanalysen wurden 1944 veröffentlicht (Avery *et al.*, 1944) und die exakte Beschreibung des DNA-Moleküls gelang Watson und Crick im Jahr 1953. Tijo und Levan beschrieben 1956 erstmals korrekt, daß der humane Karyotyp aus 46 Chromosomen besteht. Zu dieser Zeit war bereits bekannt, daß Colchizin zu einer Arretierung des Zellzyklus in der Metaphase führt (Levan, 1938) und die Chromosomen sich in diesem Teilungsstadium gut darstellen lassen. Lejeune und Mitarbeiter beschrieben 1959 die Trisomie des Chromosoms 21 beim Down-Syndrom; das Auftreten eines zusätzlichen Chromosoms 13 beim Patau-Syndrom (Patau *et al.*, 1960), die Trisomie 18 als Ursache des Edwards-Syndroms (Edwards *et al.*, 1960) und die chromosomalen Konstellationen beim Ulrich-Turner- (Ford *et al.*, 1959) sowie Klinefelter-Syndrom (Jacobs und Strong, 1959) wurden als erste klinische Chromosomenbefunde veröffentlicht. Strukturelle Chromosomenaberrationen wurden ebenfalls schon im Jahre 1960 beschrieben, so die Translokation der Chromosomen 13 und 21 bei Kindern mit Down-Syndrom (Polani *et al.*, 1960) und es wurde die erste erworbene chromosomale Aberration – das Philadelphia-Chromosom – entdeckt, welches bei der chronisch myeloischen Leukämie auftritt (Nowell und Hungerford, 1960).

Eine Bruchpunktcharakterisierung unter der heutigen Sichtweise war zu dieser Zeit noch nicht möglich, da weder eine Methode zur Charakterisierung chromosomaler Banden und deren Sub-Banden noch eine einheitliche Nomenklatur der Chromosomen zur Verfügung stand.

1.1.2 Bänderungs-Zytogenetik

Die Bänderungsära startete mit der Entdeckung und Beschreibung, daß der Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin in bestimmte Bereiche des Chromosoms interkaliert und eine reproduzierbare Bänderung der Chromosomen (*Q-Banding*) bewirkt (Caspersson *et al.*, 1968, 1970a, 1970b).

Die in der heutigen Zeit am häufigsten angewandte Methode, um Chromosomen „in helle und dunkle Bereiche zu unterteilen“, ist die GTG-Bänderung (*G-Bands by Trypsin using Giemsa*). Dabei werden die chromosomalen Proteine gezielt mit Trypsin behandelt und anschließend mit einer Giemsa-Lösung gefärbt (Seabright, 1971). Die Q-Banden sind im Wesentlichen übereinstimmend mit den Giemsa-Banden. Die R-Bänderung (Dutrillaux und Lejeune, 1971) ist eine sogenannte reverse Färbemethode, d. h., die R-negativen Banden entsprechen Giemsa-positiven Banden und umgekehrt.

Die Nomenklatur der humanen Chromosomen ist im „*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*“ (= ISCN, 1995)* (Mitelman, 1995) festgelegt, und orientiert sich am GTG-Bandenmuster der Chromosomen.

Als chromosomale Banden werden die alterierenden hellen und dunklen Bereiche auf den Chromosomen bezeichnet, die nach Färbung sichtbar werden. Eine Sub-Bande kann dann beschrieben werden, wenn sich eine Bande in mehrere „Untereinheiten“ aufgliedert (ISCN, 1995).

Eine weitere Methode der Bänderung ist die CBG-Färbung (*C-Banding using Giemsa*) (Arrighi und Hsu, 1971), die eine Anfärbung des zentromernahen Heterochromatins erlaubt. Die Darstellung der Nukleolus-organisierenden-Regionen (NORs) auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen wurde von Goodpasture und Bloom (1975) beschrieben.

Die Einführung der oben genannten Methoden erlaubte neben der Identifikation numerischer Chromosomenaberrationen auch eine Beschreibung struktureller Veränderungen, wie z. B. Inversionen, Duplikationen, Deletionen und Translokationen. Die sichere Erkennung solcher derivativer Chromosomen ist zum einen abhängig von der Art der Aberration und wird zum anderen sehr stark von dem zu untersuchenden Gewebe und der erzielten Auflösung bei der Chromosomenpräparation bestimmt. Mittels GTG-Bänderung können nur solche Veränderungen detektiert werden, die eine Verschiebung oder Größenvariation der Bandenabfolge (Grauwertabstufungen) oder des Zentromer-Index bedingen (siehe auch Abb. 1.1). Durch bestimmte Kulturbedingungen kann ein *High-resolution-banding* erzielt werden (Yunis *et al.*, 1976). Die Methode des *Chromosome-stretching* (Hlics *et al.*, 1997a) erhöht ebenfalls die Auflösung der Chromosomenpräparationen, ist aber sowohl technisch schwierig als auch zeitaufwendig und somit meist nur der Bearbeitung spezieller Fragestellungen vorbehalten.

Die GTG-Bänderung der Chromosomen erlaubt eine Bruchpunktcharakterisierung mit einer Genauigkeit von 5-10 Mb. Durch das *High-resolution-banding* und das *Chromosome-stretching* ist es möglich, chromosomale Deletionen ab einer Größe von ca. 3 Mb zu beschreiben (Küchler *et al.*, 2001). Voraussetzung dafür ist, daß die zu beurteilende chromosomale Region bekannt ist und gezielt deren Struktur untersucht werden kann.

1.1.3 Molekulare Zytogenetik

Ein neuer Bereich der Zytogenetik, der einen DNA-spezifischen Nachweis chromosomaler Bereiche ermöglicht und somit auch Aussagen zu chromosomalen Bruchpunkten erlaubt, wurde als „molekulare Zytogenetik“ bezeichnet.

1.1.3.1 Prinzip der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die der molekularen Zytogenetik zugrunde liegende Technik ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Mittels FISH ist der spezifische Nachweis von Nukleinsäuren im Zellkern und an Metaphasechromosomen möglich. Dabei werden zwei DNA-Moleküle gegeneinander hybridisiert, eines der Moleküle ist auf einem Objektträger (= Ziel-DNA) lokalisiert, die DNA-Sonde ist hingegen markiert und nicht an ein Substrat gebunden (siehe Abb. 1.2).

Mit dieser Technik und der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sonden wurde es möglich, die Lokalisation spezifischer DNA-Sequenzen direkt im biologischen Material (*in-situ*) sichtbar zu machen. Andere Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren, wie z. B. die Southern-Blot-Hybridisierung, arbeitet hingegen mit einer festen Trägermembran und *in-vitro* (Southern, 1975).

* Die erste nomenklatorische Beschreibung menschlicher Chromosomen erschien 1978 (ISCN, 1978).

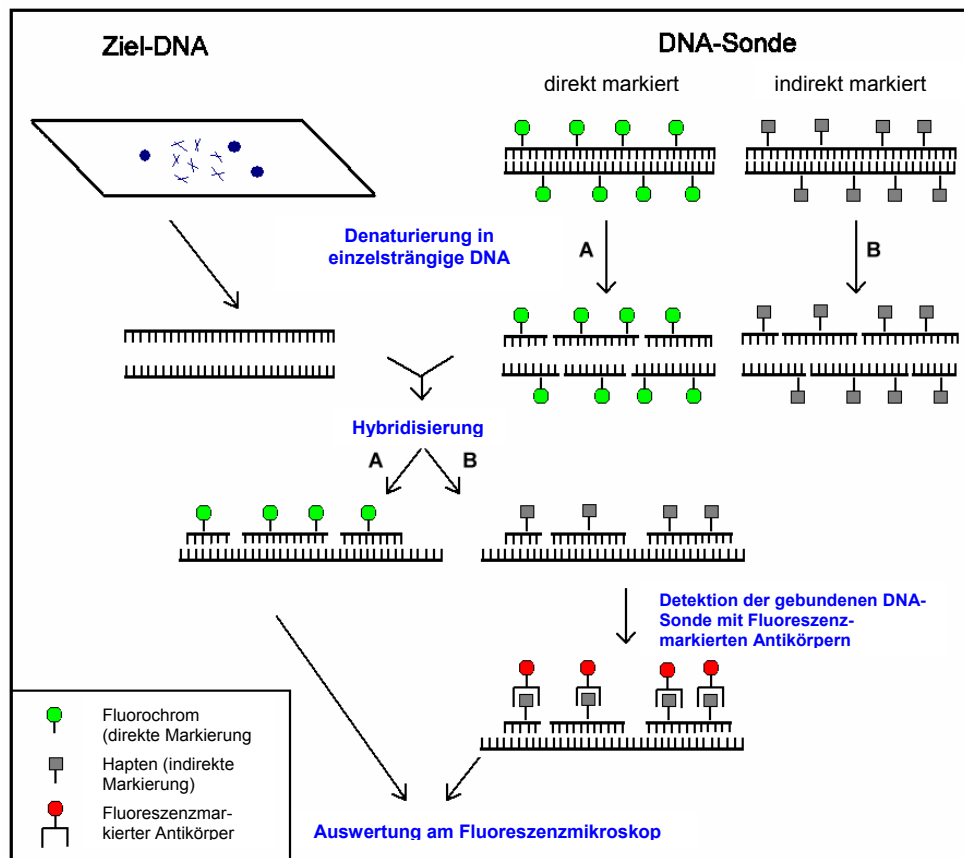


Abbildung 1.2

Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

DNA-Sonden werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Methode = **A**) oder mit Haptenen, wie Biotin oder Digoxigenin (indirekte Methode = **B**), entweder über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR) [Telenius *et al.*, 1992a] oder über eine Nick-Translation [Rigby *et al.*, 1977] markiert. Dann wird sowohl die Sonden- als auch die Ziel-DNA, welche auf einem Objektträger fixiert ist, durch Hitze- oder Alkali-Denaturierung einzelsträngig gemacht. Im anschließenden Hybridisierungsschritt lagert sich die markierte DNA-Sonde an homologe DNA-Sequenzen der unmarkierten Ziel-DNA. Nach direkter Markierung (**A**) der DNA-Sonde kann die Auswertung der Signale unmittelbar an einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Bei der indirekten Methode (**B**) ist eine vorherige Detektion der mit Haptenen markierten DNA mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nötig.

1.1.3.2 Gebräuchliche Sonden in der FISH

Folgende DNA-Sonden können bei einer Hybridisierung eingesetzt werden:

⇒ Chromosomen-Sonden (*Chromosome painting probes*)

Diese Sonden werden zur Markierung des gesamten Chromosoms [*whole chromosome painting* (wcp)] oder von Teilbereichen von Chromosomen [*partial chromosome painting* (pcp)] z. B. zum Nachweis der kurzen (p) oder der langen (q) Arme der Chromosomen eingesetzt. Weitere *Painting-probes* sind die Chromosomenregion-spezifischen Sonden [*region specific partial chromosome painting* (rpcp)]. Wcp-Sonden können sowohl durch *Flow-sorting* (z. B. Speicher *et al.*, 1996) als auch durch Mikrosezierung (Senger *et al.*, 1998) hergestellt werden. Pcp-Sonden werden entweder durch Mikrosezierung (Lüdecke *et al.*, 1990) oder aus *Radiation-hybrid-clones* (z. B. Müller *et al.*, 1997) gewonnen.

⇒ Lokusspezifische Sonden (*Single copy probes*)

Sie werden zur Sichtbarmachung bestimmter Chromosomenbanden, einzelner Gene oder definierter DNA-Sequenzen eingesetzt. Genomabschnitte werden hierbei in bestimmte künstliche DNA-Vektoren inkloniert, und stehen nach entsprechender Präparation als Sonden für die FISH zur Verfügung. Die Vektoren unterscheiden sich zum einen in der

Menge der DNA, die kloniert werden kann (diese beträgt zwischen 30 kb und 1 Mb), und zum anderen in ihrem Wirtsorganismus und können sowohl Cosmide, künstliche Bakterienchromosomen oder auch künstliche Hefechromosomen sein (Einzelheiten dazu sind unter 2.2.1 beschrieben) (Sambrook *et al.*, 1989; Shizuya *et al.*, 1992; Schlessinger, 1990).

Painting sowie lokusspezifische Sonden enthalten in unterschiedlichen Anteilen ubiquitär vorkommende repetitive Sequenzen, die zu unspezifischen Hybridisierungssignalen führen können. Durch das Prinzip der CISS-Hybridisierung (*Chromosomal in-situ suppression*) (Lichter *et al.*, 1988) werden markierte repetitive Sequenzen durch einen Überschuß an unmarkierter repetitiver DNA vor und während der Hybridisierung abgeblockt.

⇒ repetitive DNA-Sonden

Diese Sonden hybridisieren auf DNA-Abschnitten, die in vielfachen Wiederholungen im Genom vorliegen und in der Zentromer-Region oder den Telomeren anzutreffen sind. Die Zentromer-Bereiche aller menschlichen Chromosomen besitzen unter anderem individuelle α -Satelliten-Sequenzen mit Ausnahme der Chromosomen 1/5/19 sowie 13/21. Diese Satelliten-DNA besteht aus 2 - 35 Monomeren von ca. 171 Basenpaaren, die tandemförmig angeordnet sind (Wu und Manuelidis, 1980). In den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen kann man weiterhin β -Satelliten-DNA nachweisen (Lee *et al.*, 1997), Satellit-III-DNA hingegen wurde in der Bande Yq12, den kurzen Armen aller akrozentrischen Chromosomen und in der Heterochromatinregion der Chromosomen 1, 9 und 16 beschrieben (Moyzis *et al.*, 1987). Telomerspezifische Sonden hybridisieren an allen Enden (Telomeren) der Vertebraten-Chromosomen gleichermaßen. Zielsequenz ist hier das Hexanukleotid-repeat 5'-TTAGGG-3' (Blackburn und Greider, 1995).

1.1.3.3 Von der Ein- zur Vielfarben-FISH

Die ersten *in-situ*-Hybridisierungen wurden 1969 in radioaktiver Form entwickelt (Gall und Pardue, 1969; Buongiorno-Nardelli und Amaldi, 1969; John *et al.*, 1969). 1981 wurden die ersten nichtradioaktiven Hybridisierungen beschrieben (Langer *et al.*, 1981). Die erfolgreiche Anwendung dieser Technik an menschlichen Chromosomen hingegen erfolgte 1986 (Pinkel *et al.*, 1986) und leitete eine Vielzahl weiterer Entwicklungen und Anwendungsmöglichkeiten ein. So wurden noch im gleichen Jahr die ersten Zwei-Farb-FISH-Experimente beschrieben (Hopman *et al.*, 1986). Dadurch ist es erstmals gelungen, Translokations-Bruchpunkte *in-situ* darzustellen (z. B. Arnoldus *et al.*, 1990). Mittels FISH-Verfahren war es weiterhin möglich, physikalische Karten von Chromosomen zu erstellen (z. B. Liehr und Rautenstraß, 1995) – auch an DNA-Fäden (= Fiber-FISH) (Heng *et al.*, 1992). Mikrodeletionen oder Mikroduplikationen konnten beschrieben werden (z. B. Larson und Butler, 1995; Kuwano *et al.*, 1991; Malcolm, 1996). In der GTG-Analyse beschriebene derivative Chromosomen konnten charakterisiert werden (z. B. Liehr *et al.*, 1992), und Drei-Farb-FISH-Experimente (basierend auf der Anwendung von zwei Farbstoffen) wurden zur Analyse durch Bestrahlung induzierter Derivatvchromosomen eingesetzt (z. B. Gebhart *et al.*, 1996).

Durch die Anwendung von zwei Fluorochromen können drei Zielsequenzen in nur einer Hybridisierung dargestellt werden. Das Prinzip beruht dabei auf einer kombinatorischen Markierungstechnik (Nederlof *et al.*, 1989, 1990). Das *Ratio-labelling* bietet eine erweiterte Möglichkeit, mehrere Zielsequenzen mit einer begrenzten Anzahl von Fluorochromen sichtbar zu machen (Nederlof *et al.*, 1992, Dauwerse *et al.*, 1992), erfordert aber ein exaktes Mischungsverhältnis der Fluorochrome und eine hohe Stabilität derselben. Diese Art der Markierung wird in der sogenannten COBRA-FISH-Technik (*Combined binary ratio labelling*) angewandt (Tanke *et al.*, 1999).

Für die kombinatorische Markierung gilt folgende Formel zur Berechnung möglicher Farbkombinationen:

$$2^n - 1 = \text{Anzahl der möglichen Farbkombinationen}$$

(n = Zahl der einsetzbaren Fluorochrome).

1996 gelang es erstmals, alle humanen Chromosomen gleichzeitig in 24 verschiedenen Farben darzustellen (Schröck *et al.*, 1996; Speicher *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe um Schröck verwendete zur Aufnahme der unterschiedlichen Fluorochrome ein Interferometer, das die Messung des gesamten emittierten Lichtspektrums von jedem Punkt innerhalb eines Bildes ermöglicht. Vielfarben-FISH-Techniken, die diesen Aufnahmemodus verwenden, werden als **SKY-Analysen** (*Spectral karyotyping*) bezeichnet (Schröck *et al.*, 1996). Die Vorgehensweise bei **M-FISH** (*Multiplex-FISH*) (Speicher *et al.*, 1996) beruht auf der Anwendung geeigneter Filter, mit denen für alle verwendeten Fluorochrome separate Bilder aufgenommen werden können. Zur Bildaufnahme ist eine CCD- (*Charge-coupled device*)-Kamera notwendig, die auch die Darstellung von Fluorochromen, die für das menschliche Auge nicht sichtbar sind (Infrarotfarbstoffe, z. B. Cy5), ermöglicht. Beide Aufnahmemodi erfordern weiterhin eine spezielle nachgeschaltete Software, die eine Auswertung der Signale erlaubt.

Sowohl die M-FISH- als auch SKY-Technik wurden bisher in einer Vielzahl von Studien genutzt, um Aussagen zu chromosomalen Bruchpunkten derivativer Chromosomen in prä- und postnatalen Fällen (z. B. Uhrig *et al.*, 1999; Ning *et al.*, 1999; Phelan *et al.*, 1998; Peschka *et al.*, 1999) und in der Tumorzytogenetik zu treffen (z. B. Veldman *et al.*, 1997; Fleischman *et al.*, 1999; Hilgenfeld *et al.*, 1999; Mohr *et al.*, 2000; Übersicht bei Liehr, 2003/homepage-edb4).

Die der M-FISH-Technik zugrundeliegenden Sonden sind wcp-Banken, die durch ihre Größe eine Limitation der Auflösung bzw. Detektion chromosomaler Imbalancen bedingen. Die Beschreibung der Bruchpunkte erfolgt durch einen Vergleich der resultierenden Farbänderung mit dem invertierten DAPI-Bild, die Auflösung liegt bei ca. 5 Mb. Intrachromosomale Rearrangements, wie Inversionen, Deletionen oder Duplikationen, bleiben methodisch bedingt in vielen Fällen unerkannt.

1.1.3.4 FISH-Bänderungs-Methoden

FISH-Bänderungs-Methoden erlauben eine gleichzeitige Charakterisierung chromosomaler Sub-Banden, die – mit Ausnahme der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen – kleiner als die Chromosomenarme selbst sind (Liehr *et al.*, 2002b).

In diesem Abschnitt wird die Entwicklung der molekularen Zytogenetik bis zum Stand von 1999 skizziert, dem Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit.

Lengauer und Mitarbeiter führten Anfang der 90er Jahre die Technik des **Chromosome-bar-codes** ein (Lengauer *et al.*, 1992, 1993; Henegariu *et al.*, 1998). Dabei wurden YAC-Sonden mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert. Die durch YAC-Sonden erreichbare Auflösung ergibt sich durch die Größe der eingesetzten Sonden und beträgt zwischen 300 kb und 1 Mb.

Ein Bandenmuster auf den einzelnen Chromosomen kann auch durch den Einsatz von *Fragmented-hybrid-probes* erzielt werden, welche von somatischen Zellhybriden (Mensch/Nagetier) stammen (**somatic cell hybrid based chromosome bar code**). Je nach Zelllinie enthalten die Proben 5 – 15 Fragmente in einer Größe von 5 - 50 Mb, die ca. 300 Regionen des humanen Genoms unterscheidbar darstellen, was einer Bänderung von ca. 100 Banden pro haploiden Chromosomensatz entspricht (Müller *et al.*, 1997; Wienberg und Stanyon, 1997).

Beim *Cross-species-color-banding* – auch **Rx-FISH** genannt – kommen chromosomenspezifische DNA-Sonden von zwei Gibbonspezies nach *Flow-sorting* zum Einsatz. Gibbonchromosomen weisen – im Vergleich zum menschlichen Karyotyp – komplexe Veränderungen auf und eignen sich deshalb als DNA-Sonden, um ein Bandenmuster zu erzeugen. Drei DNA-Pools werden mit drei Fluorochromen markiert, simultan hybridisiert

und 80 - 90 Banden pro haploiden Karyotyp können dargestellt werden (Müller *et al.*, 1998).

Im Jahr 1998 wurde von Chudoba und Senger am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, ein Bänderungsverfahren (**multicolor banding** = MCB) am Beispiel des menschlichen Chromosoms 5 entwickelt, das auf dem Einsatz regionspezifischer Mikrosezierungsbanken beruhte (Chudoba *et al.*, 1998). Es konnte am Beispiel von Chromosom 5 gezeigt werden, daß durch diesen methodischen Ansatz eine Charakterisierung chromosomaler Bruchregionen auf einem Sub-Bandenlevel – weitgehend unabhängig vom Kondensationsgrad mit einer Auflösung von ca. 550 Banden pro haploiden Karyotyp – möglich ist (Chudoba *et al.*, 1999).

1.1.3.5 Weitere Methoden der molekularen Zytogenetik

⇒ Mikrosezierung

Eine weitere Möglichkeit, die Zusammensetzung von Derivat-Chromosomen abzuklären und deren Bruchpunkte zu bestimmen, ist die Mikrosezierung des entsprechenden Chromosoms oder Chromosomenfragments mit anschließendem *Reverse-painting* (z. B. Rubtsov *et al.*, 1996; Senger *et al.*, 1997). Das fragliche Chromosom oder die fragliche chromosomale Region wird dabei mittels einer Glasnadel von einem Chromosomenpräparat „herausgeschnitten“, und eine Vervielfältigung der in diesem Fragment enthaltenen DNA-Sequenzen durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) schließt sich an. Die so erhaltene DNA-Bank wird über eine zweite PCR markiert und in einem FISH-Experiment auf normale Metaphaseplatten hybridisiert. Die Mikrosezierung ist allerdings sowohl technisch schwierig als auch zeitaufwendig und wird nach wie vor nur in einigen wenigen Laboren mit Erfolg durchgeführt. Es ist durch Mikrosezierung nicht möglich, intrachromosomale Rearrangements (z. B. Inversionen, Insertionen oder Duplikationen) nachzuweisen und die Auflösung bezüglich Aussagen zu den Bruchpunkten beträgt – ähnlich der konventionellen Chromosomenbänderung – ca. 5 Mb.

⇒ vergleichende Genomhybridisierung

Die Comparative-genomic-hybridization (CGH) ist ein molekularzytogenetisches Verfahren, das eine umfassende Analyse von unbalanciertem chromosomalem Material des gesamten Genoms ermöglicht. Sie wurde im Jahr 1992 erstmals von Kallioniemi und Mitarbeitern beschrieben.

Bei der CGH wird genomische DNA eines Gewebes (Tumor), die spezifisch markiert ist, gemeinsam mit davon unterschiedlich markierter normaler DNA auf Metaphasechromosomen mit normalem menschlichen Karyotyp hybridisiert. Beide DNA-Sonden konkurrieren um die homologen Bindungsstellen auf den Chromosomen. Liegen im Tumormaterial Chromosomen- oder Chromosomenstückverluste vor (Unterrepräsentation) oder sind Zugewinne chromosomalen Materials zu verzeichnen (Überrepräsentation), dann finden sich entweder schwächere oder stärkere FISH-Signale der Tumor-DNA auf den entsprechenden Regionen der Metaphasechromosomen (Kallioniemi *et al.*, 1992; du Manoir *et al.*, 1993). Durch eine geeignete Software ist es wiederum möglich, die Intensitätsprofile beider Fluorochrome entlang der Chromosomen zu berechnen und miteinander zu vergleichen.

Balancierte Rearrangements, bei denen kein Verlust oder Zugewinn chromosomalen Materials vorliegt, können mittels CGH nicht detektiert werden. Das gilt für balancierte Translokationen, Inversionen und Insertionen. Ebenso sind Punktmutationen und kleine intragenetische Rearrangements nicht sichtbar (Kallioniemi *et al.*, 1994; Lichter *et al.*, 1995). In Abhängigkeit vom Kondensationsgrad der auszuwertenden Metaphasechromosomen und dem Anteil der aberranten Zellen liegen die Grenzen der Erfassung chromosomaler Imbalancen bei ca. 10 Mb (Kallioniemi *et al.*, 1992; Tönnies *et al.*, 2001). Aussagen zur Bruchregion kann die CGH mit einer den Painting-Sonden vergleichbaren Auflösung (≥ 5 Mb) darzustellen. Triploide oder tetraploide Zelllinien können nicht von einer normalen diploiden Zelllinie unterschieden werden.

Es ist also festzuhalten, daß die bis zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stehenden molekularzytogenetischen Techniken zur Charakterisierung von Bruchpunkten eine Reihe von Limitationen aufwiesen:

- Aussagen zu intrachromosomalen Rearrangements konnten in vielen Fällen nicht getroffen werden,
- komplex rearrangierte Karyotypen waren meist nicht auf Sub-Banden-Ebene zu charakterisieren,
- die Auflösung der zur Verfügung stehenden Techniken lag meist nicht über der, die nach GTG-Bänderung erzielt werden konnte.

1.2 Bruchpunkte

Brüche in der DNA können sowohl spontan bei der DNA-Replikation auftreten als auch durch ionisierende Strahlen oder andere Mutagene hervorgerufen werden. Durch effiziente Reparatursysteme der Zellen, wie Basen-Excisions-Reparatur, Nukleotid-Excisions-Reparatur, Mismatch-Reparatur, werden Mutationen in DNA-Einzel- oder Doppelsträngen größtenteils behoben, und die genomische Stabilität kann erhalten werden (Herrmann und Baumann, 1997). Bestimmten genetisch bedingten Erkrankungen liegen Defekte im DNA-Reparatur-Mechanismus zugrunde, die mit einer höheren Chromosomeninstabilität verbunden sind (Buselmaier und Tariverdian, 1999).

Nicht durch die Reparaturgene korrigierte Mutationen sowie fehlerhaft reparierte Strangbrüche können in seltenen Fällen für die einzelne Zelle einen Proliferationsvorteil bedeuten und ein malignes Zellwachstum induzieren.

Der Begriff „Bruchpunkt“ ist scheinbar klar definiert durch einen Bruch und eine Fusion in der DNA. Die bestehenden Unterschiede zwischen zytogenetischer (chromosomale Bruchpunkte) (1.2.1) und molekulargenetischer Betrachtungsweise (1.2.2) sollen im folgenden dargestellt werden.

1.2.1 Chromosomale Bruchpunkte

Nomenklatorisch wird ein chromosomaler Bruchpunkt in dieser Weise angegeben (ISCN, 1995):

„The location of any given break is specified by the band in which that break has occurred.“

Chromosomale Bruchpunkte können dann beschrieben werden, wenn ein zytogenetisch sichtbares Rearrangement stattgefunden hat, welches mit einer Strukturveränderung des entsprechenden Chromosoms einhergeht. Strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen durch Umbauten innerhalb eines Chromosoms (intrachromosomal) oder zwischen verschiedenen Chromosomen (interchromosomal).

Folgende Aberrationstypen führen zu strukturellen Veränderungen: Deletionen, Translokationen, Inversionen, Insertionen und Duplikationen und gehen mit einem bis mehreren Brüchen im Chromosom einher.

Nach Karyotypanalyse mittels GTG-Bänderung ist eine Aussage zum vorliegenden Aberrationstyp oft nicht möglich. Die Beschreibung der involvierten Bruchpunkte kann nur mit einer annähernden Größenangabe von 5 – 10 Mb erfolgen, was einer chromosomalen Bande (bei einem Bandenniveau von 300 - 500 Banden pro haploiden Karyotyp) entspricht.

Die molekularzytogenetische Untersuchung (eine DNA-spezifische Fluoreszenz-Färbung) erlaubt – je nach Art der eingesetzten Sonden – eine Eingrenzung der „Bruchstelle“ auf dem Chromosom in einem Bereich von mehreren Megabasenpaaren (Mbs) bis zu ca. 30 kb (van den Berg *et al.*, 1995).

Es muß betont werden, daß sich die zur Verfügung stehenden Sonden und Techniken nicht nur in ihrer Auflösung, sondern auch in ihrer Aussagefähigkeit bezüglich der Detektion chromosomaler Imbalancen unterscheiden. So sind durch M-FISH-Analysen, dem

Somatic-cell-hybrid-based-chromosome-bar-code und den Rx-FISH-Sonden mit einer Hybridisierung genom-umfassende Aussagen möglich, die Auflösung liegt jedoch nicht höher als mit Routine-Bänderungstechniken. Der Einsatz lokusspezifischer Sonden – diese erlauben eine Annäherung an die Bruchstelle in einer Größenordnung von ≥ 30 kb – wird jedoch erst dann möglich, wenn sowohl bereits Kenntnisse über die Art der Aberration und die darin involvierten Chromosomen bzw. chromosomalen Regionen vorliegen. Mikrodeletionen und Mikroduplikationen, die sich in konstitutionellen Aberrationen in aller Regel durch charakteristische Phänotypen darstellen, können entweder auf mikroskopischer Ebene durch FISH mit lokusspezifischen Sonden oder mittels molekulargenetischer Methoden nachgewiesen werden (z. B. Schwartz und Graf 2002; Riva *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001; Latour *et al.*, 2001).

1.2.2 Molekulargenetische Bruchpunkte

Eine Bruchpunktbestimmung auf molekulargenetischer Ebene ermöglicht Aussagen zur Basensequenz.

Bruchereignisse in der DNA können (a) zu zytogenetisch sichtbaren Veränderungen führen, (b) molekularzytogenetisch dargestellt werden oder sind (c) nicht auf chromosomaler Ebene nachweisbar, aber durch klinische Auffälligkeiten charakterisiert, die auf Mutations- bzw. Bruchereignisse in einem Gen schließen lassen. Diese Einteilung besitzt allerdings fließende Übergänge und natürlich können auch zytogenetisch oder molekularzytogenetisch aberrante Karyotypen mit charakteristischen Phänotypen einhergehen.

Um auf molekulargenetischer Ebene eine Charakterisierung der Bruchpunkte bzw. eine Identifizierung betroffener Gene vorzunehmen, muß in einem ersten Schritt die zytogenetisch als aberrant identifizierte Region weiter eingegrenzt werden. Diese Vorgehensweise wird als positionelle Klonierung bezeichnet (Strachan und Read, 1996). Physikalische und genetische Karten des entsprechenden DNA-Abschnittes können mittels DNA-Klone und Markern erstellt werden. Dadurch wird die Position des Lokus genauer bestimmt, und Kandidatengene können identifiziert werden. Als noch keine lokusspezifischen Sonden verfügbar waren, wandte man die Technik der Mikrodissektionsklonierung an (Scalenghe *et al.*, 1981), und auf diese Weise wurde 1989 das Gen für die zystische Fibrose identifiziert (Riordan *et al.*, 1989).

Läßt eine strukturelle Aberration der Chromosomen (z. B. bei hämatologischen Erkrankungen) eine Genfusion vermuten und wurde ein an der wahrscheinlich vorliegenden Aberration beteiligtes Gen bereits identifiziert und beschrieben, dann kann das Fusionsgen durch eine Sequenzierung nachgewiesen werden. Sequenzanalysen mit Datenbanken erlauben anschließend eine Beschreibung der an der Fusion beteiligten Gensequenzen.

Sind bei charakteristischen Phänotypen keine chromosomalen Bruchpunkte zuzuordnen und liegen nur Kenntnisse über das Genprodukt vor, dann kann das zugrundeliegende Gen über genspezifische Oligonukleotide oder mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden. Auf diese Weise konnte beispielsweise das verantwortliche Gen für die Hämophilie A beschrieben werden (Gitschier *et al.*, 1984). Diese Vorgehensweise wird auch als funktionelle Klonierung bezeichnet.

Die durch molekulargenetische Untersuchungen erhaltenen Informationen können umgekehrt wiederum bei zytogenetischen Bruchpunktanalysen hilfreich sein.

1.2.3 Mögliche Auswirkungen von Brüchen auf Proteinebene

Anscheinend balanciert vorliegende Translokationen oder Inversionen können durch verschiedene Mechanismen auf molekularer Ebene zu Veränderungen der Funktion von Genen führen. Wird durch einen Chromosomenbruch die codierende Sequenz oder eine

nahegelegene regulatorische Sequenz eines Gens zerstört, so kann ein Funktionsverlust-Phänotyp auftreten (Strachan und Read, 1996). Bei der Tumorgenese sind viele Beispiele beschrieben worden, wo – z. B. durch eine Translokation bedingt - der Bruch im Chromosom zu einer unangemessenen Expression eines Gens führt. Ein Beispiel ist die Burkitt-Lymphom spezifische Translokation $t(8;14)(q24;q32)$, die durch die Verlagerung der regulatorischen Sequenz des *IGH*-Gens an die distalen codierenden Sequenzen von *c-MYC* zu einer Genaktivierung und Überexpression von *c-MYC* führt (Battey *et al.*, 1983). Diese *c-MYC*-Expression wiederum bedingt die Proliferation der Zellen auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren.

1.3 Fragestellung

Bruchpunkte sind – wie unter 1.2 dargelegt – uneinheitlich charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff „Bruchpunkt“ wie folgt verwendet:

- ⇒ Das initiale Ereignis, daß zu Brüchen auf den Chromosomen führt, ist eine sichtbare Chromosomenmutation.
- ⇒ Verschiedene Aberrationstypen, wie Translokationen, Inversionen, Insertionen, Deletionen oder Duplikationen, können nach Bruchereignissen in den Chromosomen resultieren.
- ⇒ Eine Charakterisierung von Bruchpunkten beinhaltet die Beschreibung der Bruchstelle auf chromosomalem Bandenniveau laut ISCN-Nomenklatur von ≥ 550 Banden pro haploiden Karyotyp.

Ziel dieser Arbeit war es, die Lage der Bruchpunkte bei chromosomalen Aberrationen auf einem Bandenniveau ≥ 550 Banden exakt zu beschreiben und somit eine höhere Genauigkeit als mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden der Routine-Bänderung der Chromosomen zu erzielen.

Um eine exaktere Beschreibung der Aberrationen und der darin involvierten Bruchpunkte zu ermöglichen, mußte ein geeignetes DNA-basierendes Bänderungsverfahren aller menschlichen Chromosomen etabliert werden, das eine Unterscheidung chromosomaler Sub-Banden erlaubt. Es war bekannt, daß die Methode der Multicolor-Bänderung (MCB) prinzipiell geeignet ist, eine Differenzierung von chromosomalen Sub-Banden vorzunehmen und damit eine differenziertere Beschreibung von Bruchpunkten ermöglicht. Nach Evaluierung der MCB-Methode wurden Untersuchungen an Fällen mit konstitutionellen und tumorspezifischen Aberrationen vorgenommen.

Es ergaben sich folgende weiterführende Fragestellungen:

1. Inwiefern können durch eine exaktere Bruchpunktbestimmung neue, bisher nicht beschriebene Loci identifiziert werden, die gegebenenfalls eine Rolle bei einer Erkrankung spielen?
Ermöglicht eine exaktere Charakterisierung der Bruchpunkte eine bessere klinische Korrelation?
2. Sind durch DNA-basierende Bänderungsmethoden der Chromosomen und die dadurch erzielbaren Auflösungen die Voraussetzungen geschaffen, kryptische Aberrationen nachzuweisen?
3. Kann eine exaktere chromosomale Bruchpunktcharakterisierung mit Beschreibung der Sub-Banden eine gezielte weiterführende Analyse auf molekularer Ebene und somit Aussagen zu - in die Aberration involvierten - Genen ermöglichen?
4. Erlaubt die MCB-Methode eine umfassende Beurteilung der Bruchpunktverteilung im Genom nahe verwandter Spezies, und sind dadurch Aussagen im Hinblick auf evolutive Prozesse realisierbar?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

In dieser Arbeit wurden fixierte Blutzell-, Amnionzell- sowie Knochenmarksuspensionen untersucht, die zum größten Teil in der zytogenetischen Abteilung des Institutes für Humangenetik, Jena, nach Standardprotokoll präpariert wurden (Verma und Babu, 1994) und bei -20 °C lagern. In einigen Fällen lagen Zellsuspensionen vor, die von externen Laboratorien nach Standardprotokoll aufgearbeitet und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

Die ZOO-FISH-Studien erfolgten an weiblichen GGO- (Arachidiacono *et al.*, 1995) und männlichen HLA-Lymphoblastoidzellkulturen, die durch Transformation mit Epstein-Barr-Virus (EBV) – einem humanpathogenen Virus mit doppelsträngiger DNA – und anschließender Cyclosporin-A-Behandlung immortalisiert wurden (Neizel 1986). Die GGO- und HLA-Zellkulturen wurden freundlicherweise von M. Rocchi aus Bari, Italien, zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Chromosomenpräparation

Chromosomen können nur aus lebenden Zellen präpariert werden. Deshalb ist es notwendig, die Zeit zwischen der Entnahme des Untersuchungsmaterials und dem Kulturansatz möglichst zu begrenzen.

Verwendete Reagenzien:

Aqua dest.

mit Seralpur DELTA (Seral) gewonnenes Reinstwasser (entionisiert, organisch rein, partikelfrei), das zusätzlich autoklaviert wird

Aqua ad iniectabilia (Braun)

RPMI-1640 (Wachstumsmedium)

RPMI-1640 mit Glutamax-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin (Gibco)	500 ml
fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom AG)	60 ml
Penicillin (10000 U) / Streptomycin (10000 µg/ml) (Biochrom AG)	5 ml

Phytohämagglutinin (PHA)

lyophilisiertes PHA (Biochrom AG) in 5 ml *Aqua ad iniectabilia* lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern

Kaliumchlorid-Lösung (hypoton)

Kaliumchlorid (KCl) (Merck) 0,56 %
in *Aqua dest.*

Fixativ

Methanol (Merck) + Eisessig (CH₃COOH) (Merck) = 3 + 1

2.1.1.1 Chromosomenpräparation aus Blut

In eine sterile Kulturflasche (cellstar, Greiner) wurden 10 ml des Mediums *RPMI-1640* und 100 µl PHA gegeben. Das Mitogen PHA, das aus *Phaseolus vulgaris* extrahiert wird, stimuliert spezifisch die T-Zellfraktion der Lymphozyten und hat keine entsprechende Wirkung auf B-Zellen und andere Zellen der Leukopoese. Pro Ansatz wurden 1 ml heparinisiertes Vollblut zugegeben. Eine Inkubation der Lymphozytenkultur erfolgte für 72 h bei 37 °C im geschlossenen System. 1 h 30 min vor Abbruch der Kultur wurden in jeden Ansatz 100 µl Colcemid (Demecolcine, Biochrom AG) pipetiert. Dieses wird aus *Colchicum autumnale* gewonnen und ist ein Derivat des Alkaloids Colchicin. Es verhindert als Mitosegift den Aufbau des Spindelapparates. Die Zellen, die nach Zugabe von Colcemid in Mitose gehen, werden im Metaphasestadium arretiert. Zur Aufarbeitung wurden die Zellkulturen in den Flaschen vorsichtig aufgeschüttelt, in 15-ml-Falcon-Röhrchen (Greiner) überführt und anschließend 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, 10 ml der hypotonen Kaliumchlorid-Lösung (die vorher auf 37 °C erwärmt wurde) zugegeben, und eine Inkubation bei 37 °C für 18 min erfolgte. Zur Präfixierung wurde 1 ml gekühltes Fixativ zugeetzt, danach resuspendiert und anschließend 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgenommen, das Sediment in 10 ml Fixativ (4 °C) aufgenommen, gemischt und 5 min

bei 1200 U/min zentrifugiert. Die Waschvorgänge wurden 2x wiederholt. Nach dem letzten Waschschritt erfolgte eine Lagerung der Zellsuspension im Fixativ für 45 min bei -20 °C. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Sediment in ca. 2 ml Fixativ aufgenommen.

Eine Aufbewahrung der Lymphozytensuspensionen erfolgte in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäßen bei -20 °C. Diese Lagerung bewirkt, daß die DNA-schädigende Wirkung des Fixativs (durch die Essigsäure bedingt, die eine Depurinierung der DNA hervorruft und so zu Doppelstrangbrüchen führen kann) möglichst geringgehalten wird.

2.1.1.2 Chromosomenpräparation aus Knochenmark

Bei der Aufarbeitung des Knochenmarks wurden die unter 2.1.1 beschriebenen Lösungen verwendet.

Die Kultivierungsdauer des Ansatzes ist unterschiedlich (Direktpräparation, 24 h, 48 h, 72 h) und abhängig von der Diagnose bzw. der Verdachtsdiagnose.

In der Knochenmarkprobe erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Es wurden in der Kulturflasche 1×10^6 Zellen pro ml mit dem Wachstumsmedium *RPMI-1640* auf 10 ml Endvolumen eingestellt. 15 min vor Abbruch der Kultur erfolgte die Zugabe von 100 µl Colcemid (Demecolcine, Biochrom AG). Nach Resuspension der Zellen wurde die Kultur in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation 10 min bei 1500 U/min, der Überstand wurde abgesaugt. Eine hypotone Behandlung mit Kaliumchloridlösung schloß sich an (30 min bei 37 °C).

Die Präfixierung, anschließende Waschschritte und Aufbewahrung der Suspensionen erfolgten analog den Beschreibungen unter 2.1.1.1.

2.1.1.3 Chromosomenpräparation aus Amnionzellen

Verwendete Reagenzien:

AmnioMax-C100 Medium

AmnioMax-C100 Basal-Medium (Gibco)	90 ml
AmnioMax-C100 Supplement (Gibco)	15 ml

Chang-Medium (Irvine Scientific)

Basalmedium-B	90 ml
Chang-Medium-C (lypophilisiertes Supplement)	10 ml
L-Glutamin (Biochrom AG)	1 ml
Penicillin (10000 U) / Streptomycin (10000 µg/ml) (Biochrom AG)	1 ml

Hypotone Lösung

0,33 % Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (MERCK)	15 ml
1 % tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (MERCK)	10 ml
Hyaluronidase (Sigma) (50 mg in 100 ml <i>Aqua ad iniectionabilia</i> lösen \cong 150 U/ml)	1 ml
→ Lösung immer frisch ansetzen	
→ Hyaluronidase erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben	

Colcemid (Demecolcine, Biochrom AG)

Lösung (10 µg/ml) 1 : 1 mit *Aqua ad iniectionabilia* verdünnen

Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG)

Trypsin (0,05 %) und EDTA (0,02 %) in PBS

In-situ-Technik

Die Kultivierung der Amnionzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen, dabei wurde an einer Werkbank gearbeitet.

Zur routinemäßigen Aufarbeitung wurden die Amnionzellen in einer quadriPERM-plus-Kulturschale (Heraeus) in 2 Kammern mit Chang- und in 2 weiteren Kammern mit AmnioMax-C100-Medium kultiviert.

Dazu erfolgte eine Resuspendierung des Fruchtwassers in der Spritze, ein Umfüllen in 2 sterile Zentrifugenröhrchen und eine Zentrifugation bei 900 U/min für 7 min. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Sediment resuspendiert. In die quadriPERM-Schale wurden mit Seidenpapier geputzte und sterilisierte Objektträger (OTs) (Superfrost, Menzel) mit ausgeglühter Pipette eingelegt. Mittels steriler Glaspipette wurden die Kammern am oberen Rand luftblasenfrei mit den entsprechenden Medien (4 - 5 ml) gefüllt. Die Fruchtwasserzellsuspension wurde nun ein-

gesät (2 - 3 Tropfen pro Kammer). Eine Inkubation bei 37 °C unter 5 % Kohlendioxid- und 5 % Sauerstoff-Begasung erfolgte.

Ein kleiner Teil des Sedimentes wurde in Kulturflaschen angezüchtet – siehe nächster Abschnitt.

Nach einer mikroskopischen Beurteilung (inverses Mikroskop, IDO3, Zeiss) des Zellwachstums (Wachstumsansätze, Klonbildung) fand nach frühestens 4 Tagen ein erster Mediumwechsel statt. Dazu wurde die Kulturschale leicht angekippt, das Medium mit einer Glaspipette abgezogen und frisches Medium in gleichmäßigem Strahl entlang der Kammerwände zugegeben. Der weitere Mediumwechsel fand dann in gleicher Weise jeweils im Abstand von zwei Tagen statt.

Eine Beurteilung der OTs erfolgte durch mikroskopische Kontrolle, wobei sich für die weitere Aufarbeitung geeignete OTs durch mindestens zwei lockere Zellklone und einzeln vorhandene Klonansätze auszeichnen sollten. Ein geeigneter OT wurde steril entnommen und in eine (unsterile) QuadriPERM-Schale gelegt. Bei den restlichen Kulturen erfolgte ein steriler Mediumwechsel und eine Inkubation unter den oben genannten Bedingungen. Zur weiteren Präparation wurde vorsichtig AmnioMax-C100 einpipettiert und je Kammer ein Tropfen (ca. 50 µl) Colcemid (Endkonzentration ca. 0,05 µl/ml) zupipettiert. Nach 1 h 45 min wurden die OTs mikroskopiert und die Mitoserate beurteilt, waren ausreichend Mitosen sichtbar, dann wurde mit der Präparation begonnen. Dazu wurde die Schale etwas angekippt und das Medium abgezogen. Es erfolgte die Zugabe von ca. 3 ml hypotoner Lösung mit Hyaluronidase, indem die Pipette langsam am Kammerrand entlanggeführt wurde und dabei die Lösung kontinuierlich auslief. Eine erschütterungsfreie Lagerung der Platten für 9 - 10 min bei Raumtemperatur schloß sich an. Nach der Hypotonieeinwirkung erfolgte die Vorfixierung. Dazu wurde im Kühlschrank gelagertes Fixativ (ca. 3 ml) zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Aus der leicht angekippten Platte erfolgte das Absaugen des Hypotonie/Fixativ Gemisches, die Zugabe von ca. 5 ml gekühltem Fixativ schloß sich an. Nach einer Inkubation für 5 min wurde das Fixativ erneut gewechselt und weitere 10 min inkubiert. Mittels einer Pinzette wurde der OT aus der Schale entnommen, das Fixativ abgespült und luftgetrocknet.

Ist es mit der *in-situ*-Technik nicht gelungen, die für die Routine-Diagnostik erforderliche Anzahl von 10 Klonen zu erhalten bzw. war eine größere Anzahl an Amnionzellen für weitere Untersuchungen notwendig, wurde nach ca. 9 Tagen die Präparation der Kulturflaschen vorgenommen.

Ansatz in Kulturflaschen

In eine sterile Gewebekulturflasche (Greiner) wurde 3 ml Chang-Medium gegeben. Nach Zentrifugation und Resuspension des Sedimentes wurden die Fruchtwasserzellen (ca. 2 Tropfen) in die Kulturflasche eingesät und für mindestens 4 Tage bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung erschütterungsfrei stehengelassen. Ein Mediumwechsel erfolgte nach einer Woche, indem das alte Medium vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen und neues Medium zugegeben wurde. Ein Tag vor der Aufarbeitung wurde nochmals das Medium gewechselt. Am Tag der Aufarbeitung wurden die Zellklone gezählt (dabei sollten mindestens 15 Klone vorhanden sein) und das Medium entfernt und ca. 1 ml einer auf 37 °C vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung auf die Kultur gegeben. Die Kultur sollte ca. 5 min bei 37 °C inkubieren, dabei wurde mikroskopisch das Ablösen der Zellen beurteilt. In eine sterile quadriPERM-Kulturschale wurde ein steriler OT gelegt und ~ 5 ml AmnioMax-C100-Medium eingefüllt. Hatten sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst, wurde die Zellsuspension in eine sterile Pipette aufgenommen und ca. 5 Tropfen pro OT aufgebracht. Nach ca. 2 Tagen erfolgte die Aufarbeitung wie unter dem Abschnitt *in-situ*-Technik beschrieben.

Die Kulturflasche, die noch Restzellen enthielt, wurde mit 5 ml Chang-Medium aufgefüllt und weiterkultiviert, bis die erforderliche Anzahl an Zellen erhalten wurde.

Einfrieren von Amnionzellen

Da bei der Präparation der Amnionzellen die Kultivierung direkt auf OTs stattfand und somit keine Zellsuspensionen für weitere oder spätere Untersuchungen verfügbar waren, wurden Zellen von pathologischen oder außergewöhnlichen Fruchtwasserfällen eingefroren. Damit stehen die Zellen jederzeit für eine erneute Kultivierung zur Verfügung.

Lagen in einer Kulturflasche ausreichend viele und vitale Zellen vor, dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Es schloß sich unmittelbar eine Zentrifugation für 8 min bei 900 U/min an, und die Entfernung des Trypsinüberstandes erfolgte. Das Pellet wurde mit 1 ml Medium (AmnioMax-C100 oder Chang) und 0,1 ml HybriMax (Dimethylsulphoxid von Sigma) vorsichtig resuspendiert (Luftblasen dabei vermeiden) und in sterile Kryoröhrchen (Nalgene) gefüllt. Ein Vorfrieren für eine Stunde bei -20 °C und die endgültige Lagerung bei -70 °C schloß sich an.

Wurden diese eingefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen, dann war ein schnelles Auftauen dieser Zellen erforderlich. Eine Zentrifugation schloß sich an. Das Pellet wurde mit frischem Medium resuspendiert, in eine Kulturflasche eingesät und, wie oben beschrieben, weiterkultiviert.

2.1.1.4 Chromosomenpräparation der GGO- und HLA-Zelllinien

Für die Kultivierung der lymphoblastoiden Zelllinien wurden je 10 ml RPMI-1640-Medium in eine sterile Kulturflasche überführt und die bereits in Kultur gewachsenen Zellen zugefügt. Optimale Wachstumsbedingungen lagen bei 37 °C mit einer 5 % CO₂-Begasung und einer Kulturdauer von ca. 5 Tagen.

Die weitere Präparation der Zellen erfolgte wie unter 2.1.1.1 beschrieben.

2.1.2 Herstellung von Objektträger-Präparaten für konventionelle zytogenetische Methoden und FISH

Das Auftropfen der Zellsuspensionen kann sowohl auf mit Seidenpapier gereinigten OTs als auch in einem Methanol-Salzsäure-Gemisch gelagerten OTs erfolgen. Beide Möglichkeiten wurden bei Suspensionen mit nur wenigen Metaphasen bzw. schlechterer Chromosomenmorphologie, wie sie häufiger gerade in Knochenmarkzellen zu finden ist, alternativ angewandt.

Vor dem Auftropfen wurden die vorbehandelten OTs in *Aqua dest.* überführt und bei 4 °C gekühlt. Eine feuchte Kammer wurde bei ca. 40 °C vorgewärmt, um so ein Mikroklima zu schaffen, in welchem eine erhöhte Luftfeuchtigkeit herrschte (Hliscs *et al.*, 1997b). Die OTs wurden schräg in die feuchte Kammer gestellt. Das Auftropfen der Zellsuspension erfolgte, und Fixativ wurde nachgetropft, wobei das Methanol-Essigsäuregemisch eine weitere Proteindenaturierung und somit Fixierung der Zellen bewirkte. Nach der Verdunstung des Methanols übte die Essigsäure eine stark hygroskopische Wirkung aus, die wiederum durch Aufnahme von Wasser aus der Atmosphäre zu einer Quellung und damit Sichtbarmachung der Chromosomen führte (Claussen *et al.*, 2002). Die OTs trockneten auf der Heizplatte bei ca. 40 - 50 °C.

Wurden **konventionelle zytogenetische Bänderungsmethoden** angewandt, dann wurden die OTs über Nacht im Trockenschrank gealtert, alternativ wurde eine Alterung der OTs bei 90 °C für 1 h gewählt.

Erfolgte mit den Präparaten eine **molekularzytogenetische Analyse**, dann schloß sich zuerst eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe an. Bei Raumtemperatur (RT) wurden die OTs etwa 7 Tage aufbewahrt, bevor sie dann bei -20 °C eingefroren wurden und so über längere Zeit lagerten.

2.2 Verwendete DNA-Sonden

Im folgenden werden nun die in dieser Arbeit für molekularzytogenetische Analysen verwendeten DNA-Sonden tabellarisch aufgelistet. Auf die Markierung der einzelnen hier aufgelisteten Sonden sowie auf die Zusammenstellung der Sonden zu spezifischen Sondensets wird im Ergebnisteil näher eingegangen.

2.2.1 YAC-, BAC-Sonden und Plasmide

YACs (*yeast artificial chromosomes*) sind Klonierungsvektoren, mit deren Hilfe lineare, sehr lange DNA-Fragmente vermehrt werden können (Burke *et al.*, 1987). Um die Funktion normaler Chromosomen und damit die Vermehrung zu gewährleisten, enthalten YACs einen Replikationsursprung (*origin of replication*), Zentromer und Telomere. Zusätzlich benötigen sie eine Klonierungsstelle (*cloning site*) und ein Gen, welches die Selektion nach Transformation in den Wirt ermöglicht. DNA-Fragmente von mehreren hundert kb bis über 1 Mb Länge können kloniert werden, wobei die YAC-Vektoren selber nur bis ca. 10 kb groß sind (Sambrook *et al.*, 1989).

⇒ Die in dieser Arbeit verwendeten YAC-Sonden lagen jeweils als DNA-Stocklösungen vor.

BACs (*bacterial artificial chromosomes*) sind Vektoren, die Fragmente bis 300 kb Länge aufnehmen können. Die zirkulären Moleküle beruhen auf den F-Faktoren (Sex-Faktor-Plasmid) von *E. coli* (Shizuya *et al.*, 1992).

Bei **Plasmiden** handelt es sich um zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die neben dem bakteriellen Genom vorliegen und sich unabhängig davon vermehren können. Die Größe der Plasmidvektoren liegt zwischen 2,5–5 kb (Mühlhardt, 2002).

Cosmide sind Plasmide, die zusätzlich eine für λ -Phagen wichtige Eigenschaft, die *Cos-site*, besitzen. Dadurch wird es möglich, 40–50 kb große DNA-Fragmente, die infektiös wie Phagen sind, in die DNA von Bakterien einzuschleusen. Kommt es zur Ligation mit der Bakterien-DNA, kommen nunmehr die Plasmideigenschaften zum Tragen (Mühlhardt, 2002).

⇒ Die in dieser Arbeit verwendeten BAC-Sonden und Plasmide standen jeweils als Bakterienstocklösungen zur Verfügung, die DNA-Präparation erfolgte mittels eines Miniprep-Kit (Quiagen) (siehe Punkt 2.4.1).

Tabelle 2.1

Auflistung und Kartierung der in dieser Arbeit verwendeten YAC-, BAC-Sonden und Plasmide

Sonden- typ	Bezeichnung	Lokalisation	Anmer- kungen
YAC- Sonden	YAC 841a05	13q12	freund- licher- weise zur Ver- fügung gestellt von - H.-U. G. Weier, Berkeley (CA), USA - M. Rocchi, Bari, Italien
	YAC 768a04	13q12	
	YAC 943e04	13q12	
	YAC 931f04	13q12	
	YAC 895f08	13q12-13	
	YAC 939b04	13q12-13	
	YAC 877d05	13q12-13	
	YAC 748e04	13q12.3-13	
	YAC 951a03	13q13	
	YAC 963h11	13q13	
	YAC 818b12	13q13-14.1	
	YAC 911f06	13q14	
	YAC 984g06	13q14	
	YAC 761d09	13q14	
	YAC 940g04	13q14	
	YAC 933e09	13q14	
	YAC 954c12	13q14	
	YAC 818f11	13q14	
	YAC 843e11	13q14	
	YAC 955g07	13q14	
	YAC 843e09	13q14.2-14.3	
	YAC 923e02	13q14-21	
	YAC 784g06	13q14-21	
	YAC 693e02	13q14-21	
	YAC 937c07	13q14-21	
	YAC 745e03	13q14-21	
	YAC 935g02	13q14-21	
	YAC 418c06	13q14-21	
	YAC 806f06	13q14-21	
	YAC 936b06	13q14.3-21.1	
	YAC 906a04	13q21.1-21.2	
	YAC 802g08	13q21.1-21.2	
	YAC iB09121	13q21	
	YAC iE02154	13q21	
	YAC 845c10	13q21	
	YAC 876f02	13q21	
	YAC 759h05	13q21	
	YAC 790d02	13q21.1-21.2	
	YAC 801b11	13q21.1-21.2	
	YAC 908b01	13q21.2-21.3	
	YAC 758b01	13q21.2-21.3	
	YAC 945a10	13q21-22	
	YAC 744f11	13q21-22	
	YAC 854b07	13q21-22	
	YAC 940b09	13q21-22	
	YAC 930c05	13q22	
	YAC 814h11	13q22	
Sonden- typ	Bezeichnung	Lokalisation	Anmer- kungen
YAC- Sonden	YAC 843c03	13q22	freund- licher- weise zur Ver- fügung gestellt von - H.-U. G. Weier, Berkeley (CA), USA - M. Rocchi, Bari, Italien
	YAC 911g04	13q22	
	YAC 835f12	13q22	
	YAC 750h05	13q22	
	YAC 792a09	13q22	
	YAC 852g02	13q22	
	YAC 968g12	13q22-31	
	YAC 841f03	13q22-31	
	YAC 758c09	13q22-31	
	YAC 921f02	13q22-31	
	YAC 804a04	13q31	
	YAC 854b05	13q31	
	YAC 961h10	13q31	
	YAC 838c01	13q31	
	YAC iD01116	13q31	
	YAC 871e09	13q31-32	
	YAC 811h06	13q31-32	
	YAC 847e10	13q31-32	
	YAC 909g03	13q32	
	YAC 911d04	13q32	
	YAC 839b05	13q32	
	YAC 737f10	13q32	
	YAC 795a03	13q32	
	YAC 927c11	13q32	
	YAC 761g06	13q32-33	
	YAC 947e06	13q32-33	
	YAC 935g10	13q32-33	
	YAC 943g06	13q33-34	
	YAC 842g06	13q33-34	
	YAC 775f11	13q33-34	
	YAC 846f05	13q33-34	
	YAC 857b04	13q33-34	
	YAC 743d08	13q33-34	
	YAC 950d10	13q33-34	
	YAC 794g05	13q33-34	
	YAC 935g10	13q34	
	747b3	9q22.1	freund- licher- weise zur Ver- fügung gestellt von der CEPH- YAC Bibliothek - <i>edb2</i>
	931d9	9q22.2-22.3	
	908f11	9q22.2-22.3	
	933g6	9q22.2-22.3	
	857g10	9q22.2-22.3	
	957h08	9q31	
	806f02	9q21.3-22.1	
	906g6	9q21.3-22.1	
	945f5	9q21.3-22.1	
	870b4	9q22.3-31	
	750c6	9q31.3-32	

Fortsetzung **Tabelle 2.1**

Sonden- typ	Bezeichnung	Lokalisation	Anmer- kungen
YAC- Sonden	933c05	9q31.3-32	
	827e4	5q34	
	782b10	5q32-33	
Plasmid- Sonden	pTRS-47	14p11, 22p11	standen im Labor von L.G. Shaffer, Houston, USA zur Ver- fügung
	pTRS-63	14p11	
	pTRI-6	13p11, 21p11	
	pU 6.2	enthält 18S rRNA (NOR), hybridisiert in Bande p12 aller akrozentrischen Chromosomen	
	dJ1174A5	NOR-Sonde, hybridisiert in p12 aller akrozentrischer Chromosomen	zur Ver- fügung gestellt von M.
	plaY113.5	Yq12	Rocchi, Bari, Italien

Sonden- typ	Bezeichnung	Lokalisation	Anmer- kungen
BAC- Sonden	688B7	8q12.1	zur Ver- fügung gestellt von M. Rocchi, Bari, Italien
	366K18	8q13.1	
	382J12	8q13.3	
	697L23	8q21.11	
	51M18	8q21.13	
	353O11	8q21.3	
	bA91A15	3p12.1	
	bA21I16	3q12.1	
	bA19F12	5p12	
	bA160F8	5q11.2	
	bA746M1	17p11.2	
	bA229K15	17q12.2	
	subtel 1p-12p subtel 16p-20p subtel 1q-22q, subtel Xp, Xq, subtel Yq	Subtelomer- region der ent- sprechenden Chromosomen	zur Ver- fügung gestellt von L. Kearney, Oxford, UK

Weitere YAC- und BAC-Sonden, die zur Konstruktion eines YAC/BAC-basierenden MCBs für Chromosomen 2 und 22 eingesetzt wurden, sind ausführlich in Liehr *et al.*, 2002a beschrieben.

2.2.2 Durch Mikrosezierung hergestellte DNA-Sonden

Die Herstellung dieser Sonden erfolgte am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena.

Tabelle 2.2

Auflistung und Kartierung der in dieser Arbeit verwendeten und durch Mikrosezierung hergestellten Sonden

Sondentyp	Bezeichnung	Lokalisation	Anmerkungen	Zitate
DNA-Banken für alle humanen Chromosomen	wcp 1-22 wcpX wcpY	jeweils komplettes Chromosom	Mikrosezierung von G. Senger und I. Chudoba (Jena)	Senger <i>et al.</i> , 1998
Chromosomen-armspezifische DNA-Banken	pcp 1q-22q pcp 1p-12p pcp 16p-20p pcp Xp pcp Xq	jeweils kurze oder lange Chromosomenarme (ohne p-Arme der akrozentrischen Chromosomen)	Mikrosezierung von G. Senger und I. Chudoba (Jena)	Liehr und Claussen, 2002
Regionspezifische DNA-Banken	rpcp's: 138 Banken wurden jeweils zu Chromosom-spezifischen MCB-Mixen zusammengefaßt	138 Banken verteilt über alle menschlichen Chromosomen	Mikrosezierung von U. Claussen, A. Heller und H. Starke (Jena) + V. Trifonov und N. Rubtsov (Novosibirsk, Rußland)	Mrasek <i>et al.</i> , 2001
Weitere region-spezifische DNA-Banken	midl 54	alle p-Arme der akrozentrischen Chromosomen	Mikrosezierung von G. Senger (Jena)	Mrasek <i>et al.</i> , 2001
	midl 36	9p12 und 9q13-21.1	Mikrosezierung von G. Senger (Jena)	Starke <i>et al.</i> , 2002
	midl 23	9p12-9q22.1	Mikrosezierung von G. Senger (Jena)	
	midl 18	9p12-9q11	Mikrosezierung von G. Senger (Jena)	
	midl 12	Zentromer-Regionen der Chromosomen 5 und 6	Mikrosezierung von G. Senger (Jena)	Nietzel <i>et al.</i> , 2001
	midl 58	18pter→18q11.2:: 18q12.2→18qter	Mikrosezierung von G. Senger (Jena)	Mrasek <i>et al.</i> , 2001

2.2.3 Zentromerspezifische Sonden

Es wurden zentromerspezifische Sonden, die am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, aus Plasmiden gewonnen und markiert wurden (Nietzel *et al.*, 2001), eingesetzt. Diese Sonden wurden freundlicherweise von M. Rocchi, Bari, Italien, zur Verfügung gestellt.

In einigen Fällen wurden zur weiteren Analyse unklarer Bruchereignisse kommerziell erhältliche zentromerspezifische Sonden folgender Firmen eingesetzt:

- ABBOTT (früher VYSIS)
- Q-BIOgene (früher Oncor).

Die Sonden selber sind jeweils im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.4 Weitere Lokusspezifische Sonden

Kommerziell erhältliche lokusspezifische Sonden folgender Firmen wurden auf einige Chromosomenpräparationen hybridisiert:

- ABBOTT (früher VYSIS)
- Q-BIOgene (früher Oncor).

Auch hier wird auf die einzelnen Sonden jeweils im Ergebnisteil näher eingegangen.

2.2.5 Verwendete Sondenmixe

Am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, wurden verschiedene Sondenmixe etabliert und standen für einzelne Untersuchungen zur Verfügung.

Tabelle 2.3
Beschreibung weiterer zur Verfügung stehenden Sondenmixe

Sondenmix	Bezeichnung der verwendeten Sonden	Zitate mit den entsprechenden Markierungsschemata
M-FISH	wcp 1-22, wcp X, wcp Y	Senger <i>et al.</i> , 1998
25M-FISH	wcp 1-22, wcp X, wcp Y + midi 54	Mrasek <i>et al.</i> , 2001
cenM-FISH	cep 1-22, cep X, cep Y, midi 12	Nietzel <i>et al.</i> , 2001
cen54M-FISH	cep 1-22, cep X, cep Y, midi 12 + midi 54	Nietzel <i>et al.</i> , 2003
acro-cenM-FISH	cep 13/21, cep 14/22, cep 15, cep 22, Yq12, NOR, midi 54	Trifonov <i>et al.</i> , 2003
sub-cen-Mix	für Chr. 1-12, 16-20, X: p- und q-Arm-spezifische Sonden + cenBAC für p und q + cep-Sonde für Chr. 13-15 + 21, 22: q-Arm-Sonde + cen-BAC für q + cep + midi 54	Starke <i>et al.</i> , -in press

2.3 Mikrosezierung von Chromosomen bzw. Kernen (*Micro-CGH*)

Während der gesamten Mikrosezierung wurde steril gearbeitet, und bei den vorbereitenden Tätigkeiten sollten Handschuhe (ungepudert) getragen werden. Die Ansätze der verwendeten Lösungen erfolgten weitestgehend unter einer sterilen Werkbank, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Mikrosezierung sollte möglichst räumlich getrennt, vor allem bei Arbeiten mit DNA, durchgeführt werden.

2.3.1 Verwendete Lösungen und Materialien

Trypsin-Lösung:

Für eine 5 %ige Stammlösung wurde eine Ampulle lyophilisiertes Bacto-Trypsin (DIFCO) in *Aqua ad iniectionem* gelöst.

Eine sterile Filtration und Portionierung der Lösung (Lagerung bei -20 °C) erfolgte.

Die Trypsin-Lösung zur Bänderung wurde aus 100 µl der Stammlösung plus 35 ml Phosphat Puffer (pH 6,88) (Merck) in einem sterilen 50-ml-Plastik-Röhrchen (Greiner) hergestellt.

Giemsa-Lösung:

35 ml Phosphat-Puffer-Lösung (pH 6,88) (Merck) wurde in ein steriles 50-ml-Plastik-Röhrchen (Greiner) gegeben und mit 3 ml steriler Giemsa-Lösung (Merck) (mit einer sterilen Spritze aufgezogen) vermischt.

Collection-drop-Lösung:

Als Sammellösung diente eine Mischung aus:

- 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) (Merck)
- 10 mM NaCl (Merck)
- und *Aqua ad iniectabilia*.

Diese Lösung wurde in einem autoklavierten und anschließend UV-bestrahlten Gefäß autoklaviert. Danach setzte man 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma) dazu, aliquotierte die Lösung und bestrahlte sie nochmals mit UV. Die Lagerung erfolgte anschließend bei RT.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden noch

- 0,5 mg/ml (Endkonzentration) Proteinase-K (Boehringer)
- und 50 µl Glycerol (Merck) zugegeben.

Herstellen der Glasnadeln

Die Glasnadeln zum Sammeln der Chromosomenfragmente wurden mit einem Pipettenziehgerät (Narishige, Modell PB-7) aus 10 cm langen, massiven Duranglasstäben (Schott Rohrglas GmbH) mit einem Durchmesser von 2 mm hergestellt. Zuerst wurde der Glasstab in Stufe 1 mit maximaler Heizkraft dünn ausgezogen, jedoch noch nicht abgerissen. Erst in Stufe 2 mit geringer Heizkraft und einem zusätzlichen Gewicht wurde nun der dünne Teil des Glasstabes abgerissen. Beide Hälften konnten nun als Nadeln zum Sammeln verwendet werden.

Der vordere Teil der Glasnadeln durfte nicht zu lang sein, damit die Nadel nicht zu flexibel waren. Vor Gebrauch wurden die Nadeln unter UV-Licht ca. 2 h sterilisiert.

Herstellen der Sammelpipetten

Zum Sammeln der geschnittenen Fragmente wurden Pasteurpipetten aus Glas (225 mm, Brand) verwendet. Das Ausziehen der Pipettenspitze erfolgte am gleichen Pipettenziehgerät wie die Herstellung der Glasnadeln. In Stufe 1 bei 80 %iger Heizkraft erfolgte schon ein Ausziehen der Pipettenspitze, das endgültige Abreißen jedoch erst in der 2. Stufe bei mittlerer Heizkraft. Die vordere Spitze der Pipette wurde im Bereich der Heizwendel vorsichtig abgebrochen. Es war für die Durchführung der Mikrosezierung ohne Bedeutung, ob die damit erzielte Öffnung glatte Bruchkanten hatte oder nicht. Direkt vor Benutzung der Pipetten wurden diese nochmals ca. 1 h bei UV-Licht bestrahlt, um eine völlige DNA-Freiheit zu gewährleisten.

Beschickung der Sammelpipette:

Zur Ablage der geschnittenen Fragmente wurde eine Pasteurpipette verwendet. Das Einfüllen mit der vorbereiteten *Collection-drop*-Lösung erfolgte. Man verwendete dazu einen Mundschlauch, der mit einer 10-ml-Spritze verbunden ist. Mit diesem wurde die Lösung vorsichtig aufgezogen, bis die dünne Spitze der Pipette gefüllt war. Es stellte sich als günstig heraus, Luft mit aufzuziehen, um die Kapillarkräfte auszuschalten und zu verhindern, daß die Chromosomenfragmente in der Pipette nach oben gezogen wurden. Die gesammelten Fragmente befanden sich somit später nur in der vorderen, mit Flüssigkeit gefüllten Spitze der Pipette. Das war insofern wichtig, da bei Überführung der geschnittenen Bank in die PCR-Lösung nur die vorderste Spitze abgebrochen wurde.

Vorbereitung der Deckgläschen

Für das Spreiten der Metaphasen waren gut gereinigte Deckgläschen (60x24 mm, Menzel) notwendig. Sie wurden vor der Mikrosezierung einige Tage in 10 %iger SDS-Lösung (Sigma) entfettet.

Herstellung und Bänderung der Präparate:

Die mit SDS vorbehandelten Deckgläser wurden gründlich mit sterilem *Aqua dest* gespült. Auf die noch feuchten Deckgläser wurden je nach Zelldichte 1 - 2 Tropfen Zellsuspension gegeben. Bevor das Fixativ vollständig verdunstete, erfolgte das vorsichtige Auftropfen frischen Fixativs, um eine bessere Spreitung der Metaphasen zu erzielen. Anschließend wurden die Präparate getrocknet und gefärbt.

Die Bänderung der vorbereiteten Metaphasepräparate erfolgte unter sterilen Bedingungen nach folgendem Schema:

- Behandlung mit Phosphat Puffer für 1 min
- Inkubation in der Trypsin-Lösung je nach Präparat 40 - 60 s (plasmareiche Präparate müssen in der Regel länger trypsinisiert werden)
- Färbung in der vorbereiteten Giemsa-Lösung für 2 - 3 min
- kurzes Spülen in sterilem *Aqua dest.*
- Lufttrocknung.

Durch zu lange Trypsinierung quellen die Chromosomen stark und sind dann sehr weich, was insbesondere für das exakte Schneiden kleinerer Chromosomenbereiche von Nachteil ist.

2.3.2 Durchführung der Chromosomen-Mikrosezierung

(nach Rubtsov *et al.*, 1996)

Beim Sammeln der Fragmente wurden keine Handschuhe getragen, um eine elektrostatische Aufladung zu vermeiden, die zu einem Wegfliegen der Fragmente von der Nadel hätten führen können.

Die Mikrosezierung wurde an einem Inversmikroskop (Axiovert-135 oder Axiovert-10, Zeiss) durchgeführt. Folgende Objektive wurden benötigt: Vergrößerung 10x (Plan-Neofluar) und 100x (Plan-Neofluar, Öl-Immersion). Am Mikroskopstativ waren zwei elektronisch kontrollierte Mikromanipulatoren (Firma Merzhäuser) befestigt; diese ermöglichten in allen drei Achsen auch sehr langsame Bewegungen.

In die Halterung des links neben dem Mikroskop platzierten Mikromanipulators wurde die mit *Collection-drop* bestückte Sammelpipette eingespannt. Ein gewöhnlicher Druckbleistift diente als Nadelhalter für eine sterile Glasnadel; dieser wurde auf der rechten Seite platziert. Sowohl die Sammelpipette als auch die Glasnadel wurden am Mikroskop mit dem 10er Objektiv zentriert. Mit dieser Vergrößerung erfolgte auch die Einstellung der Objektebene. Zu beachten war, daß ausreichend Platz zwischen dem Präparat und der Sammelpipette blieb, um jegliche Berührung der Pipette mit dem Präparat zu vermeiden. Nun wurde eine geeignete Metaphase auf dem Deckglas gesucht und mit dem 100er Objektiv in die Mitte des Bildfeldes eingestellt.

Durch den drehbaren Objektisch war es möglich, das zu schneidende Chromosom in die gewünschte Stellung zur Nadel zu bringen. Danach wurde nochmals in der kleineren Vergrößerung kontrolliert, ob sich die Nadel im Bereich der eingestellten Metaphase befindet und senkte sie dann mit Einstellung des 100er Objektives langsam manuell auf die Metaphase ab. Sobald sich im Bildfeld ein dunkler Schatten der Nadel ausmachen ließ, wurde zur weiteren Absenkung der Nadel nur noch der Joystick verwendet. Die Absenkung der Nadel nach unten erfolgte, bis sie vor der zu schneidenden Bande auf dem Deckglas aufsetzte. Durch ein weiteres Absenken der Nadel und die damit verbundene Vorwärtsbewegung konnte das entsprechende Fragment aus dem Chromosom herausgeschnitten werden. Sollte dagegen die Isolierung eines Chromosomenarms oder eines kompletten Chromosoms erfolgen, war es günstig, das Chromosom durch „gezielte“ Vibrationen der Nadel zusammenzuschieben und somit in einem „Stück“ aufzunehmen (Abb. 2.1). Eine erfolgreiche Aufnahme der geschnittenen Stücke gestaltete sich erfahrungsgemäß günstiger, wenn das Fragment vorher mit der Nadel umgedreht wurde, da die Unterseite klebriger und somit hafter war.

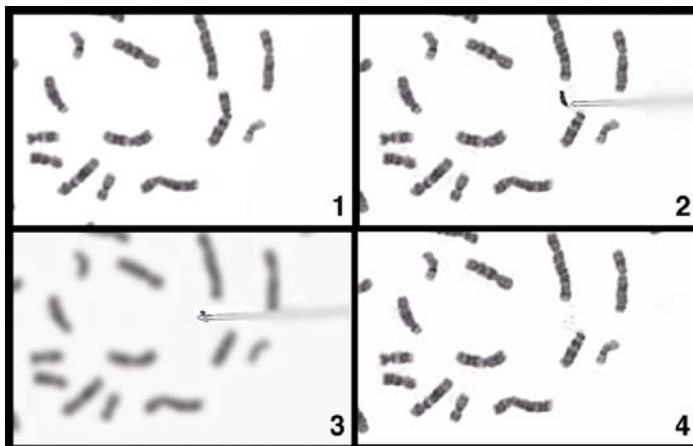
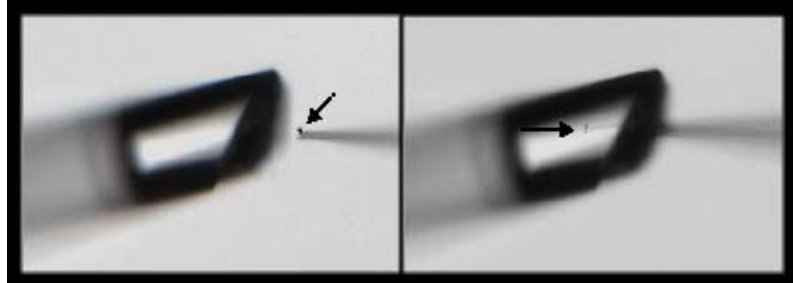


Abb. 2.1
Mikrosezierung des kurzen Arms von Chromosom 7

- (1) Das zu schneidende Objekt wurde in die gewünschte Position gebracht.
- (2) Der p-Arm des Chromosoms wurde mit der Glasnadel exakt herausgeschnitten und zusammengeschieben.
- (3) Die Aufnahme des Fragments erfolgte.
- (4) Nochmalige Kontrolle des bearbeiteten Chromosoms.

Hing das Fragment dann an der Nadel, bewegte man die Nadel zuerst mit dem Joystick und dann mechanisch nach oben bis in Höhe der Sammelpipette. Die Ablage des Fragments in die Sammelpipette wurde im 10er Objektiv beobachtet. Dazu wurde die Nadel mit dem anhaftenden Chromosom bzw. Chromosomenstück in die mit Flüssigkeit gefüllte Spitze der Pipette eingeführt und leicht in der Flüssigkeit bewegt. Dadurch löste sich das Fragment von der Nadel. In gleicher Weise wurde mit den nächsten Chromosomenstücken verfahren, bis sich die gewünschte Anzahl an Fragmenten in der Sammelpipette befand (Abb. 2.2). Für eine gute DNA-Bank wurden in der Regel 5 - 20 Fragmente benötigt.

Abb. 2.2
Übertragung des an der Nadel befindlichen Fragments (Pfeilspitze) in die mit *Collection-drop* bestückte Sammelpipette



Mit einer Nadel konnten sehr viele Chromosomen der gleichen Bank geschnitten werden, sofern die Nadel nicht beim Schneiden beschädigt wird oder versehentlich ein Kontakt mit anderen Chromosomen erfolgte.

Nach dem Sammeln der Fragmente wurde ein Verdau der Proteine mit der im *Collection-drop* enthaltenen Proteinase-K durchgeführt. Dafür legte man die Sammelpipette in eine Metallschale, die in einem Wasserbad stand (feuchte Kammer) und inkubierte für 2 h bei 60 °C. Die Einwirkung der Proteinase-K sollte aufgrund der Spaltung der Proteine zu einer effektiveren Amplifizierung mittels DOP-PCR beitragen.

Nach dem Proteinverdau wurde die DNA-Bank in die vorbereitete erste PCR-Lösung (siehe 2.4.3.1.1.) überführt. Dies erfolgte alternativ durch das Abbrechen der Spitze der Sammelpipette, in der sich die chromosomalen Fragmente befanden oder das Ausblasen des Inhaltes der Sammelpipette in ein 500-µl-PCR-Gefäß (safe lock, Eppendorf) mit entsprechender PCR-Lösung.

2.3.3 Sammeln von Kernen für *Micro-CGH*

(nach Chudoba *et al.*, 1997, Heller *et al.*, 2000)

Die für die Aufnahme der Kerne notwendigen Glasnadeln wurden hergestellt und sterilisiert, wie unter 2.3.1. beschrieben.

Die Vorbereitung der Deckglaspräparate erfolgte ebenfalls analog. Da beim Sammeln der Kerne die Chromosomenmorphologie nicht von Bedeutung war, wurde auf eine Trypsinierung der Präparate verzichtet und nur eine Färbung der luftgetrockneten Präparate in der oben beschriebenen Giemsa-Färbelösung für 3 min vorgenommen. Nach einer Spülung in *Aqua dest.* wurde die Unterseite des Präparates getrocknet, während die Oberseite mit *Aqua dest.* befeuchtet und auch im weiteren Verlauf des Sammelns feuchtgehalten wurde.

Im Unterschied zu dem unter Punkt 2.3.2 beschriebenen Procedere der Mikrosezierung von Chromosomen oder -fragmenten wurden die aufgenommenen Kerne nicht in einer Sammelpipette aufgenommen, sondern durch Abbrechen der Glasnadel in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Somit konnte hier auf die Herstellung und Vorbereitung der Sammelpipette verzichtet werden. Das PCR-Gefäß zum Sammeln der Kerne enthielt neben Sequenase-Puffer (Amersham) auch Proteinase-K (Roche) (= Ansatz 1). Sequenase-Puffer wurde mit einer Endkonzentration von 0,75x eingesetzt, da sich nach Zugabe der Lösungen zur DOP-PCR (siehe unter 2.4.3.1.2.) durch eine weitere Verdünnung die gewünschte Endkonzentration von 0,6x ergibt.

Ansatz 1:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank
<i>Aqua ad iniectabilia</i>			2,9 µl
Sequenase-Puffer	5 x	0,75 x	0,8 µl
Proteinase-K	14,4 mg/ml	4,3 mg/ml	1,6 µl

Von diesem Ansatz wurden 4 µl in ein 500-µl-PCR-Gefäß pipettiert.

Die Zentrierung der Glasnadel und Einstellung der Objektebene erfolgte.

Günstig zum Sammeln waren 2 - 4 Kerne, die relativ dicht beieinanderlagen und daher zusammen in einem Arbeitsvorgang mit einer Nadel aufgenommen werden konnten.

Die Nadel wurde nun manuell vorsichtig nach unten bewegt. Sobald sie den Flüssigkeitsfilm berührte, wurde der Joystick für weitere Nadelbewegungen benutzt. Unter Sicht wurde sie auf das Deckglas neben den Kernen aufgesetzt. Die Zellen konnten nun zusammengeschoben werden; dabei war es wichtig, auch eventuell vorhandenes Plasma mit zu isolieren. Somit konnte eine vollständige Aufnahme der Zellkerne gewährleistet werden. Der Vorgang der Zellkernisolierung ist in Abb. 2.3 dargestellt.

Das Zellmaterial wurde mit der Nadel aufgenommen und diese nach oben über den Flüssigkeitsfilm bewegt. Mit einer Vergrößerung von 10x konnte nun kontrolliert werden, ob die Kerne an der Nadelspitze hängen. Durch Erschütterungen bzw. zu schnelles Bewegen der Nadel nach oben oder beim Austritt aus der Flüssigkeit sowie durch ungünstige elektrostatische Verhältnisse kann das Zellmaterial von der Nadel abfallen. Auf dem Boden des vorbereiteten PCR-Gefäßes wurde die Nadel abgebrochen. Dabei war es sehr wichtig, die Wand des PCR-Gefäßes nicht mit der Nadelspitze zu berühren. In der eben beschriebenen Weise wurde die entsprechende Zahl der Kerne (zwischen 5 und 20 Kernen) gesammelt. Zur Generierung der Normal-DNA wurden unter den gleichen Bedingungen Kerne einer Person mit einem unauffälligen Karyotyp gesammelt.

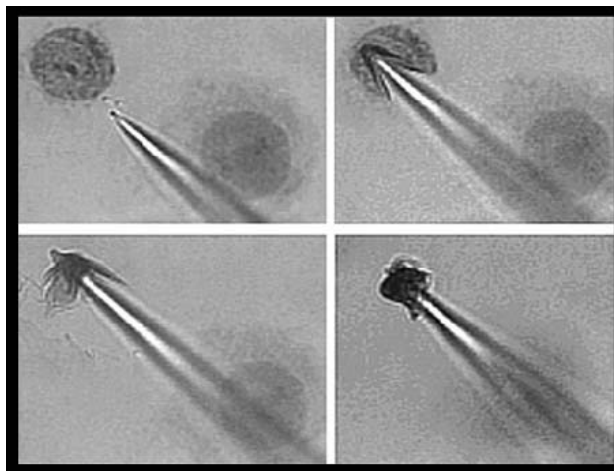


Abb. 2.3
Aufnahme der
gefärbten Kerne
vom Deckglas
mit einer Glas-
nadel

Nun erfolgte der Proteinverdau. Dazu wurde der Ansatz im PCR-Gefäß 2 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die DOP-PCR (siehe 2.4.3.1.2.).

2.4 Molekulargenetische Techniken

2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Verwendete Reagenzien:

LB-(Luria-Bertani)-Medium

- 10 g Pepton ((Merck)
- 5 g Hefeextrakt (Sigma)
- 10 g NaCl (Merck)
- mit *Aqua dest.* auf 800 ml auffüllen
- mit NaOH pH 7 einstellen
- nun auf 1 l auffüllen und autoklavieren

Zur Isolierung der Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aus *E. coli* kam der QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen) zum Einsatz. Er erlaubt eine schnelle, einfache und kosteneffektive DNA-Präparation bis zu 20 µg DNA (QIAprep Miniprep Handbuch, Qiagen). Es wird dabei die Silica-Gel-Membran-Technologie genutzt, wobei die DNA in geringem Volumen Tris-Puffer oder *Aqua dest.* eluiert wird. Die Ausbeute an DNA liegt bei ca. 70 %.

In einem sterilen 50-ml-Falcon-Röhrchen (Greiner) erfolgte unter Einsatz der entsprechenden Antibiotika die Anzucht der Bakterien in einer Schüttelkultur. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Impföse mit der Bakterienstocklösung beimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 250 µl Puffer **P1** resuspendiert und in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer **P2** und 350 µl Puffer **N3** erfolgte eine vorsichtige Mischung. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Mit 750 µl Puffer **PE** erfolgte eine Waschung, es schlossen sich erneut Zentrifugationsschritte an. Zum Eluieren der DNA wurden 50 µl Puffer **EB** (10 mM TrisHCl, pH 8,5) oder *Aqua ad iniectionem* auf die Membran gegeben und nach kurzer Inkubationszeit zentrifugiert.

Von der so gewonnenen Lösung wurde mittels Spektrometer der DNA-Gehalt bestimmt und die DNA-Stocklösung wurde nunmehr bei -20 °C gelagert.

2.4.2 c-DNA Synthese

2.4.2.1 Isolierung von RNA aus fixierten Knochenmarkzellen

Für die Isolierung von RNA aus Knochenmarkzellen, die in Methanol-Eisessig fixiert vorlagen, wurde der RNeasy-Mini-Kit (Qiagen) verwendet (Handbuch zum Kit, Qiagen).

Dazu wurden – abhängig von der Zelldichte – 200 - 500 µl der Zellsuspension bei RT zentrifugiert (5 min/13000 rpm). Nach Entfernen des Überstandes erfolgte eine Waschung des Pellets mit 96 % EtOH und eine erneute Zentrifugation schloß sich an (Henic *et al.*, 1995; Strehl *et al.*, 2001).

Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes wurden 350 µl (Zelldichte von bis zu 5×10^6 Zellen) oder 600 µl (Zelldichte von 5×10^6 – 1×10^7 Zellen) β -Mercaptoethanol-haltiger Puffer **RLT** zugegeben, um ein Aufbrechen der Zellen zu ermöglichen. Zur Homogenisierung des Zelllysates erfolgte ein mindestens einminütiges Vortexen, anschließend erfolgte die Zugabe von 350 bzw. 600 µl 70 % EtOH, und ein erneutes Mischen schloß sich an. Nun wurde das Lysat auf die RNeasy-Säulen übertragen (max. 700 µl pro Säule) und zentrifugiert. Das Waschen erfolgte mit 700 µl Puffer **RW1** und 2x 500 µl Puffer **RPE**. Nach jeder Zugabe schloß sich jeweils eine Zentrifugation an. Nach der Verdunstung des Ethanols wurden 30 - 50 µl *Aqua ad iniectionem* direkt auf die Membran gegeben und nach kurzer Einwirkzeit zentrifugiert. Waren höhere RNA-Mengen zu erwarten, wurden die Elutionsschritte wiederholt. Eine Bestimmung der optischen Dichte schloß sich an. Die RNA wurde anschließend bei -70 °C gelagert.

2.4.2.2 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Die *First-strand*-c-DNA Synthese-Reaktion wird von dem Enzym SuperScript-II-RNase-H – Reverse-Transkriptase (Invitrogen) katalysiert. Dieses Enzym wurde konstruiert, um die RNase-H-Aktivität, die in anderen Reverse-Transkriptase-Enzymen gefunden wurde und die die m-RNA während der *First-strand*-Reaktion degradiert, zu eliminieren. Dadurch konnte eine bessere c-DNA-Ausbeute erzielt werden.

Für eine Menge von 1 - 5 µg totaler RNA bzw. 50 - 500 ng m-RNA wurde eine 20-µl-Reaktion durchgeführt.

Dabei wurden 50 - 250 ng Random-Primer/Hexamere (Gibco) mit RNA-Lösung gemischt, so daß eine Gesamtmenge von 12 µl entstand. Steigende Hexamer-Mengen (bis 250 ng pro 5 µg RNA)

können die Ausbeute an kleineren PCR-Produkten (< 500 bp) erhöhen; allerdings kommt es dabei zur Erniedrigung der Ausbeute an langen PCR-Produkten und Transkripten, die in ganzer Länge erhalten bleiben.

Folgendes Protokoll wurde angewandt (die notwendigen Temperaturschritte wurden im Thermocycler PTC-200 (Peltier Thermal Cycler von Biozym Diagnostik GmbH) erzielt):

- | | | |
|----|--|---|
| 1. | 70 °C, 15 min | ➤ Denaturierung der RNA, die mit sich selbst hybridisiert |
| 2. | 4 °C, 1 min | |
| 3. | <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 4 µl
 + 2 µl
 + 1 µl
 <hr style="width: 50px; border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 2px 0;"/> 7 µl </div> | <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 5 x <i>First-strand</i>-Puffer
 0,1 M DTT
 10,0 mM dNTP Mix </div> |
| | Zugabe dieser Lösung, gründliches Mischen, Zentrifugieren | |
| 4. | 25 °C, 10 min | ➤ Primer binden an RNA |
| 5. | 42 °C, 2 min | |
| | 1 µl Enzym SuperScript II zugeben, mischen | |
| 6. | 42 °C, 53 min | ➤ Synthese |
| 7. | 70 °C, 15 min | ➤ Denaturierung der synthetisierten Fragmente |

Die erhaltene c-DNA wurde anschließend bei –20 °C aufbewahrt.

2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) wird eingesetzt, um eine exponentielle *in-vitro*-Amplifikation von DNA-Segmenten zu erzielen (Saiki *et al.*, 1985).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden dadurch DNA-Banken für FISH-Analysen amplifiziert und mit entsprechenden Liganden versehen, weiterhin war eine spezifische PCR notwendig, um eine Genfusion zu sequenzieren.

Für die Standard-PCR werden eine (thermostabile) DNA-Polymerase, passende Oligonukleotidprimer, Puffer, Nukleotide und natürlich Ausgangs-DNA (im weiteren auch *Template* genannt) benötigt.

Eine PCR-Reaktion besteht aus den Einzelschritten der Denaturierung, des *Annealing* und der *Elongation*, wobei mehrere Zyklen hintereinander durchlaufen werden:

- Denaturierung: Aufschmelzen des doppelsträngigen DNA-*Templates*
- *Annealing*: Anlagerung der Primer an die DNA
- *Elongation*: Verlängerung des DNA-Stranges, an welchen der Primer gebunden hat.

Je nach Aufgabenstellung können sowohl spezifische Primer, und damit eine gezielte Amplifikation eines definierten DNA-Fragments, als auch unspezifische Primer, mit denen es möglich wird, beliebige, unbekannte Zielsequenzen bzw. die DNA des gesamten Genoms zu amplifizieren, eingesetzt werden.

- Die nun folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen und an einer sterilen Werkbank durchgeführt.
- Alle verwendeten Lösungen mußten steril sein und durften keine Nukleasen oder Fremd-DNA enthalten. Es empfahl sich daher, die Lösungen in kleine Aliquots zu portionieren.
- Notwendige Lösungen und Ansätze wurden jeweils mit *Aqua ad iniectionabilia* (Braun) verdünnt bzw. hergestellt. Im folgenden wird dafür die Bezeichnung: *Aqua ad* verwendet.
- Die PCR-Reaktionen wurden jeweils in einem Thermocycler PTC-200 (Peltier Thermal Cycler von Biozym Diagnostik GmbH) durchgeführt.

2.4.3.1 DOP-PCR

Die DOP-PCR wurde erstmals von Telenius *et al.* 1992a beschrieben. Unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotidprimern ist es möglich geworden, beliebige, unbekannte Zielsequenzen zu amplifizieren. Das 3'-Ende besitzt 6 spezifische Basen, daran schließen sich einige unspezifische, zufällig gewählte Nukleinsäuren, die man auch als degenerierte Sequenzen bezeichnet. Die 5'-Phosphatgruppe besitzt wiederum definierte Basen (Bohlander *et al.*, 1992). Während der ersten PCR-Zyklen wird eine niedrige *Annealing*-Temperatur gewählt (*low temperature cycle*), so daß sich

der Primer an vielen verschiedenen Stellen auf der Ziel-DNA anlagern kann. Je niedriger die *Annealing*-Temperatur gewählt wird, umso unspezifischer und damit häufiger bindet der Primer an die DNA. Die Stellen, an die sich der Primer anlagert, sind definiert durch die teilweise spezifischen Sequenzen am 3'-Ende. Die in diesen ersten Zyklen entstandenen DNA-Fragmente lösen sich jeweils von der Ziel-DNA ab und durch die erneute Anlagerung neuer Primer werden genügend Fragmente für die folgenden Zyklen synthetisiert. Dabei erfolgt das *Annealing* bei höheren Temperaturen (*high temperature cycle*). Mit dieser Methode der PCR kann effektiv die DNA des gesamten Genoms amplifiziert werden (Telenius *et al.*, 1992b).

Verwendete Reagenzien:

DOP-Primer

Sequenz: 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'

Die Synthese wurde von Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld, Institut für Virologie, Jena, durchgeführt und das Produkt uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

dNTPs

Aus den Nukleotiden (GeneAmp dNTPs, Perkin Elmer) wurde eine Gebrauchslösung hergestellt; dabei wurden die einzelnen Nukleotide (à 10 mM) im Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1 gemischt. Somit ergab sich für jedes Nukleotid eine Konzentration von 2,5 mM.

T7-Sequenase-2.0-DNA-Polymerase (Amersham)

Stammlösung: 13 U/μl

(wurde zusammen geliefert mit Sequenase-Puffer und Sequenase-Enzyme-Dilution-Buffer)

Das Enzym Sequenase wurde 1 : 8 in Sequenase-Enzyme-Dilution-Buffer verdünnt.

AmpliTag-DNA-Polymerase-Stoffel-Fragment (Perkin Elmer)

Stammlösung: 10 U/μl

(wurde zusammen geliefert mit 10x Stoffel-Fragment-Puffer und 25 mM

Magnesiumchlorid [MgCl₂])

GeneAmp-10x-PCR-Puffer-II (Perkin Elmer)

100 mM Tris-HCl; pH 8,3; 500 mM KCl

Label-Mix

GeneAmp-dNTPs, Perkin Elmer

Je 2 mM dATP, dCTP und dGTP sowie 1 mM dTTP* wurden gemischt.

* Anstelle des Nukleotids dTTP wurde während der PCR ein Hapten bzw. Fluorochrom in die DNA eingebaut.

AmpliTag DNA-Polymerase (Perkin Elmer)

Stammlösung: 5 U/μl

2.4.3.1.1 DNA-Amplifikation der mikrosezierten Chromosomenfragmente

(nach Rubtsov *et al.*, 1996)

Um eine effektive Amplifikation der relativ geringen DNA-Mengen, die nach Mikrosezierung weniger Fragmente vorlagen, zu gewährleisten, wurde die PCR mit 8 Sequenasezyklen durchgeführt.

Lösung A:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank
<i>Aqua ad</i>			3,37 μl
Sequenase-Puffer	5,0 x	0,6 x	0,60 μl
DOP-Primer	40,0 μM	5,0 μM	0,63 μl
dNTPs	à 2,5 mM	200,0 μM	0,40 μl

⇒ Diese Lösung wurde ca. 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit der Proteinase-K (die Inhibierung der Proteinase-K erfolgte nach Start der PCR durch initiale Denaturierung) pipettiert.

Pro DNA-Bank gab man 5 μl in ein 500-μl-PCR-Gefäß.

Nach Überführung des *Collection drops* mit den geschnittenen DNA-Banken wurde die PCR gestartet.

Lösung B – mit Enzym für Low-temperature-cycles:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank
Sequenase-Enzyme-Dilution-Buffer			1,75 µl
Sequenase	13 U/µl	1,6 U/µl	0,25 µl

⇒ In den ersten 8 Zyklen wurde Sequenase verwendet, die nicht thermostabil ist. Daher erfolgte die Zugabe von je 0,25 µl in jedem Zyklus nach der Denaturierung.

Lösung C:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank
Aqua ad			34,22 µl
Stoffel-Fragment-Puffer	10,0 x	1,0 x	5,00 µl
dNTPs	à 2,5 mM	220,0 µM	4,40 µl
DOP-Primer	40,0 µM	1,1 µM	1,38 µl
MgCl ₂	25,0 mM	2,5 mM	5,00 µl

⇒ Die *High-temperature*-PCR wurde in einem Volumen von 55 µl durchgeführt. Durch Zugabe von 45 µl der Lösung C wurde die dafür erforderliche Volumenvergrößerung erreicht.

Lösung D – mit Enzym für High-temperature-cycles:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank
Aqua ad			4,9 µl
Stoffel-Fragment-Puffer	10 x	1,0 x	0,7 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	0,7 µl
AmpliTaQ-DNA-Polymerase-			
Stoffel-Fragment	10 U/µl	1,0 U/µl	0,7 µl

⇒ Es wurden 5 µl des Enzym-Mixes zugegeben.
Die nachträgliche Enzymzugabe liegt darin begründet, daß die Primer vor Zugabe der Polymerase einen Denaturierungsschritt durchlaufen und so eine Anlagerung untereinander in den degenerierten Sequenzen verhindert wird.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

8 Zyklen	{	5 min	92 °C	➤ initiale Denaturierung
		2 min 20 s	25 °C	← hier Zugabe von 0,25 µl Lösung B
		2 min	34 °C	➤ Primer-Annealing
		1 min	90 °C	➤ DNA-Elongation
		2 min 20 s	30 °C	➤ Denaturierung
		1 min	92 °C	← hier Zugabe von 45 µl Lösung C
		2 min 20 s	56 °C	➤ Denaturierung
				← hier Zugabe von 5 µl Lösung D
32 Zyklen	{	2 min	70 °C	➤ Primer-Annealing
		1 min	92 °C	➤ DNA-Elongation
		1 min	56 °C	➤ Denaturierung
		2 min	70 °C	➤ Primer-Annealing
		10 min	72 °C	➤ DNA-Elongation
			4 °C	

Zur Aufbewahrung wurden die amplifizierten Banken mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) von Sigma in einer Endkonzentration von 5 mM versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.4.3.1.2 DNA-Amplifikation der mikrosezierten Kerne

(nach Heller *et al.*, 2000)

Das Sammeln der Kerne erfolgte im Ansatz 1 (siehe auch 2.3.3.), welcher bereits Sequenase-Puffer enthält. Durch Zugabe von Lösung A-1 wurden der DOP-Primer und die Nukleotide zugeführt.

Lösung A-1:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank
DOP-Primer	40,0 µM	5 µM	0,83 µl
dNTPs	à 2,5 mM	200 µM	0,53 µl

⇒ Nach dem Proteinverdau und vor Start der PCR wurde 1 µl der Lösung zu dem bereits vorhandenen Ansatz pipettiert. Das Gesamtvolumen im PCR-Gefäß betrug somit 5 µl.

Die weiteren Lösungs-Ansätze sowie das verwendete PCR-Protokoll ist unter Punkt 2.4.3.1.1 beschrieben.

2.4.3.1.3 DNA-Amplifikation der YAC- und Plasmid-Sonden

Durch eine modifizierte DOP-PCR mit nur 3 Sequenasezyklen wurden die Bedingungen geschaffen, die verwendeten DNA-Stocklösungen der YAC-Banken sowie die Plasmidpräparationen der *Single-copy*-DNA für spätere Reamplifikationen bzw. Markierungen einzusetzen.

Die PCR-Lösungen wurden, wie unter 2.4.3.1.1. beschrieben, eingesetzt.

Das PCR-Protokoll wurde dahingegen modifiziert, daß anstelle von 8 *Low-temperature-cycles* nur 3 Sequenasezyklen durchgeführt wurden, die *High-temperature-cycles* wurden unverändert übernommen.

2.4.3.1.4 Reamplifizierungs-PCR

Um zu gewährleisten, daß die mikrosezierten Banken immer in ausreichender Menge verfügbar sind, wurden alle Stocklösungen (= DNA-Lösung nach erster Amplifikation) nochmals reamplifiziert (im folgenden als 1R-Banken bezeichnet). Als günstig beim Umgang mit diesen Banken hat sich erwiesen, die 1R-Banken nochmals zu reamplifizieren (entspricht dann 2R-Banken) und diese 2R-Banken jeweils für Markierungs-PCRs einzusetzen. Durch Anwendung dieses Amplifizierungs-(und letztlich auch Konservierungs-)Schemas wird es möglich, eine mikrosezierte DNA-Bank in $3,3 \times 10^6$ FISH-Experimenten einzusetzen (Liehr *et al.*, 2002).

PCR-Ansatz:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank
<i>Aqua ad</i>			34,25 µl
Stoffel-Fragment-Puffer	10 x	1 x	5,00 µl
dNTPs	à 2,5 mM	220,0 µM	4,00 µl
DOP-Primer	40,0 µM	1,0 µM	1,25 µl
MgCl ₂	25,0 mM	2,5 mM	5,00 µl
AmpliTaq-DNA-Polymerase-			
Stoffel-Fragment	10 U/µl	1,0 U/µl	0,50 µl

⇒ Zu einem 50 µl Reamplifizierungsansatz wurden je 0,5 µl der DNA-Bank (Stocklösung, 1R oder 2R) pipettiert.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

29 Zyklen	{	3 min	92 °C	➤ initiale Denaturierung
		1 min	91 °C	➤ Denaturierung
		1 min	56 °C	➤ Primer-Annealing
		2 min	70 °C	➤ DNA-Elongation
		10 min	72 °C	
			4 °C	

Die reamplifizierten Banken wurden zur Aufbewahrung ebenfalls mit EDTA in einer Endkonzentration von 5 mM versetzt und bei -20 °C gelagert.

Auch die *Single-copy*-Banken wurden nach erster DOP-PCR (siehe 2.4.3.1.3.) reamplifiziert, bevor eine Markierungs-PCR durchgeführt wurde.

Es hat sich bei den YAC-Banken als geeignet herausgestellt, die *Annealing*-Temperatur bei 40 °C zu wählen (mündliche Mitteilung von Dr. J. Wirth, Berlin).

2.4.3.1.5 Markierungs-PCR

Eine Markierung der vorliegenden DNA-Banken erfolgte mittels einer weiteren PCR, bei welcher der Einbau modifizierter Nukleotide erfolgte.

Durch diese Markierungs-PCR wurden sowohl Einzelbanken markiert als auch zu DNA-Pools zusammengefaßte Banken. Die Strategie der Markierung für die MCB-Sondenmixe bestand darin, die Einzelbanken jeweils getrennt zu labeln und erst bei DNA-Fällung (siehe 2.6.1) zusammen zu pipettieren.

Gleiches traf auch für die M-FISH-Sonden zu.

Die DNA-Banken der Tumorzellen bzw. der Lymphozyten mit chromosomalen Aberrationen, die nach *Micro-CGH* zu Verfügung standen, wurden mit Biotin-16-dUTP markiert, die Normal-DNA-Banken mit Digoxigenin-11-dUTP.

Folgende Fluorochrome kamen - je nach Fragestellung - zum Einsatz:

Tabelle 2.4

Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Abkürzung	Firma	Absorptionsmaximum (in nm)	Emissionsmaximum (in nm)
Fluorochrome zur direkten Markierung der DNA				
Diethylaminocoumarin-5-dUTP	<i>DEAC</i>	NEN Life Science Products, Inc.	426	480
Fluorescein-12-dUTP	<i>Fluo</i>	Roche	495	521
SpectrumGreen-dUTP	<i>SG</i>	Vysis/ABBOTT	497	524
R110-dUTP	<i>R110</i>	Perkin Elmer Applied Biosystems	502	530
SpectrumOrange-dUTP	<i>SO</i>	Vysis/ABBOTT	559	588
ChromaTide-TexasRed-12-dUTP	<i>TR</i>	Molecular Probes	587	612
SpectrumRed-dUTP	<i>SR</i>	Vysis/ABBOTT	595	615
Verwendete Fluorochrome nach indirekter Markierung der DNA mit Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP (Roche)				
Avidin-Fluorescein-5-iso-Thiocyanat	<i>FITC</i>	Vector Laboratories	494	518
α -Digoxigenin-Cy3	<i>α-Dig-Cy3</i>	Dianova	550	570
α -Digoxigenin-Rhodamine	<i>α-Dig-Rhod</i>	Roche	596	615
FluoroLink-Cy5-labelled-streptavidin	<i>Cy5</i>	Amersham pharmacia	649	670
FluoroLink-(anti-Digoxigenin)-Cy5.5	<i>Cy5.5</i>	Amersham pharmacia	675	694

Eine grafische Darstellung der Absorptions- und Emissionswellenlängen ist im Anhang (Abb. 8.1) einzusehen.

Markierungs-Ansatz *:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank [µl]
<i>Aqua ad</i>			12,48
10 x Puffer	10 x	2 x	2,00
DOP-Primer	40 µM	2,00 µM	1,00
<i>Label-mix</i>	10 x	1 x	2,00
MgCl ₂	25 mM	2,50 mM	2,00
modifiziertes Nukleotid	(entsprechend Angaben des Herstellers)		0,4 - 1,50 **
AmpliTaQ-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,03 U/µl	0,12

* In aller Regel wurde pro Bank ein 20-µl-Ansatz gewählt, 50-µl- oder 100-µl-Ansätze konnten auch problemlos zur Markierung von DNA-Banken eingesetzt werden.

** Je nach eingesetzter Menge wurde das Volumen von *Aqua ad* korrigiert.

⇒ Zu einem 20-µl-Markierungs-Ansatz wurden je 1 - 2 µl der DNA-Bank pipettiert.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

19 Zyklen	{	3 min	92 °C	➤ initiale Denaturierung
		1 min	91 °C	➤ Denaturierung
		1 min	56 °C	➤ Primer- <i>Annealing</i>
		2 min	70 °C	➤ DNA- <i>Elongation</i>
		10 min	72 °C	
			4 °C	

2.4.3.2 Spezifische PCR

Zum Nachweis von Genen, Genabschnitten oder Genfusionen ist es notwendig, eine PCR mit spezifischen Primern durchzuführen.

Um sehr geringe *Template*-Mengen nachzuweisen, bedient man sich des Prinzips der *Nested-PCR*, wobei in einer ersten Reaktion ein weiter auseinandergelegenes Primerpaar verwendet wird. Dieses Produkt wird nun in einer zweiten Reaktion - mit zwischen den ersten Primerpaar gelegenen Primern - eingesetzt. Dadurch wird es möglich, die bei der ersten Reaktion entstehenden falschen PCR-Produkte „auszuschalten“.

Folgende Primerpaare wurden von Dr. Birch-Hirschfeld synthetisiert und in dieser Arbeit eingesetzt:

- 1. PCR 4F1 5'-CTA TGG ACA GCA GGA CCG TG-3'
- 8R 5'-CAT AGT AGT AAC GGA GGG CG-3'
- 2. PCR T1 5'-GGT GGC TAT GAA CCC AGA GG-3'
- E2 5'-CCT CGT CGG GAT CCG TCA TC-3'

Die für die PCR notwendigen Lösungen wurden bereits unter Punkt 2.4.3.1. beschrieben.

1. PCR-Ansatz:

	Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank [µl]
<i>Aqua ad</i>			14,25
10 x Puffer	10 x	1 x	2,50
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3,00
dNTPs	10 x	0,80 x	2,00
Primer 4F1	10 µM	0,20 µM	0,50
8R	10 µM	0,20 µM	0,50
AmpliTaQ-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl	0,25

⇒ Zu diesem Ansatz wurden 2 µl der c-DNA pipettiert.

2. PCR-Ansatz:

		Stammlösung	Endkonzentration	pro Bank [μl]
Aqua ad				17,55
10 x Puffer		10 x	1 x	2,50
MgCl ₂		25 mM	1,50 mM	1,50
dNTPs		10 x	1,00 x	1,20
Primer	T1	10 μM	0,20 μM	0,50
	E2	10 μM	0,20 μM	0,50
AmpliTaQ-DNA-Polymerase		5 U/μl	0,05 U/μl	0,25

⇒ Diesem Ansatz wurde 1 μl des Produktes nach 1. PCR beigelegt.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt - sowohl für erste als auch zweite PCR - gewählt:

33 Zyklen	{	3 min	94 °C	➤ initiale Denaturierung
		45 sec	94 °C	➤ Denaturierung
		45 sec	60 °C	➤ Primer-Annealing
		45 sec	72 °C	➤ DNA-Elongation
		6 min	72 °C	
			4 °C	

2.4.4 Nick-Translation zum Einbringen von markierten Nukleotiden

Bei der Nick-Translation (Rigby *et al.*, 1977) führt man in einen DNA-Strang mit einer Desoxyribonuklease in Gegenwart von Magnesiumionen Einzelstrangbrüche (*nicks*) ein. So entstehen freie 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Nach Zugabe einer DNA-Polymerase wird die Bruchstelle zum Ausgangspunkt für eine Reaktion, bei der am 3'-Hydroxylende neue Nukleotide eingeführt werden. Durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms kommt es gleichzeitig zum Abbau alter Nukleotide auf der anderen Seite der Bruchstelle. So wird dieser Bruch entlang der DNA in 5'→3'-Richtung verschoben, und auf diese Weise integriert man markierte Nukleotide in die DNA. Wird die Reaktion bei 15 °C durchgeführt, so kommt es zu einer vollständigen Erneuerung der alten Nukleotidsequenz (Strachan und Read, 1996).

In dieser Arbeit wurde der Biotin-16-dUTP- bzw. Digoxigenin-11-dUTP-Nick-Kit von Roche verwendet. Dabei wurde je 1 μg der DNA-Sonde in 16 μl H₂O verdünnt und mit 4 μl des Biotin- oder Digoxigenin-Nick-Translation-Mixes, der neben o. g. Enzymen auch die Nukleotide und entsprechende Puffer enthält, versetzt. Die Reaktion erfolgte bei 15 °C für 90 min und wurde durch eine anschließende Denaturierung (10 min bei 65 °C) gestoppt.

Das Fälen der markierten DNA erfolgte anschließend wie unter 2.6.1 beschrieben.

2.4.5 DNA-Sequenzierung

Mit der DNA-Sequenzierung kann die genaue Basenabfolge einer Sequenz bestimmt werden. Neben der Mutationssuche wird sie, wie in der vorliegenden Arbeit, auch genutzt, um auf molekularer Ebene die Bruchpunkte einer Genfusion (hier die Fusion *FUS/ERG*) zu ermitteln.

Maxam und Gilbert beschrieben 1977 erstmals eine DNA-Sequenzierung, die auf einem chemischen Verfahren beruhte. In der neueren Zeit bedient man sich enzymatischer Methoden. So sind neben einer DNA-Polymerase ein einzelsträngiges DNA-*Template* und ein komplementärer Sequenzierungsprimer, der spezifisch an einen Abschnitt der DNA-Matrize bindet, sowie Didesoxynukleotide (ddNTPs) erforderlich (Strachan und Read, 1996). Die ddNTPs sind Analoga der normalen dNTPs und liegen neben diesen vor, unterscheiden sich aber dadurch, daß ihnen ein 2'-Kohlenstoff und am 3'-Kohlenstoffatom eine Hydroxylgruppe fehlt. Ein Didesoxynukleotid kann durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung mit dem vorher eingebauten Nukleotid in das wachsende DNA-Molekül eingebaut werden. Es kommt dann aber zum Stop der Synthese, da den ddNTPs die Hydroxylgruppe fehlt, die notwendig ist, um ebenfalls eine Phosphodiesterbindung auszubilden. Parallel werden 4 basenspezifische Reaktionen durchgeführt; dabei enthält jeder Ansatz die dNTPs und eines der vier ddNTP in einer geringen Konzentration. Der Abbruch der DNA-Synthese erfolgt zufällig und liegt dadurch in einer statistischen Verteilung vor. Somit erhält man eine Population von DNA-Fragmenten verschiedener Größe, die – festgelegt durch den Primer – ein übereinstimmendes 5'-Ende und variable 3'-Enden besitzen.

Um die in der Größe variablen Fragmente unterscheiden zu können, ist es notwendig, markierte Gruppen in die Reaktion einzubringen. Dazu wird entweder ein 5'-fluoreszenzmarkierter Primer verwendet, oder es werden markierte Nukleotide zugesetzt, die während der Synthese eingebaut

werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, markierte Didesoxynukleotide einzusetzen. Die Auftrennung der entstandenen Fragmente erfolgt durch ein denaturierendes Gel. Durch das Lesen des Gels kann nun die 5' → 3'-Sequenz ermittelt werden, die zu dem ursprünglich eingesetzten DNA-*Template* komplementär ist.

Bei diesem Experiment wurden die mit IRD-800-markierten und in ihrer Sequenz bereits unter Punkt 2.4.3.2. beschriebenen inneren Primer (hergestellt von der Firma MWG Biotech) *E2 und *T1 verwendet. Somit war eine Sequenzierung des Fragments in beide Richtungen möglich.

Verwendete Reagenzien:

50x TAE-Puffer

Tris (Merck)	242,0 g
Eisessig (Merck)	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0) (Sigma)	100,0 ml
add 1000 ml <i>Aqua dest.</i>	
→ autoklavieren	

Sequenziergel 6 %

- 30 ml Sequagel-XR (Biozym)
- 7,5 ml Sequagel-Puffer (Biozym)
- 300 µl 10 % Amoniumpersulfat (APS) (Sigma)
- gut mischen
- Zum Gießen des Gels wurde eine 41-cm-Platte mit einem 0,25-mm-Spacer und ein Kamm mit 48 Zähnen verwendet.

Die zu sequenzierende DNA wurde durch Ausschneiden der entsprechenden Bande aus dem Gel gewonnen. Dazu war es notwendig, ein 2,8 %iges Gel mit Seakem-Agarose (Biozym) mit 50x TAE-Puffer herzustellen. Das durch *Nested-PCR* (siehe Punkt 2.4.3.2) gewonnene Produkt wurde aufgetragen (in 2 Spuren je 9 µl DNA-Lösung); nach der Auftrennung erfolgte das Ausschneiden der erhaltenen Bande. Die DNA beider Gelstücke wurde anschließend mit dem Microcon-100-Kit (Amicon) extrahiert und lag in einem Endvolumen von ca. 75 µl vor.

Eine Aufkonzentrierung der DNA war durch eine Fällung mit 6 M Ammoniumacetat möglich.

Die Sequenzierung wurde mit dem *SequiTherm-Exel-II-DNA-Sequencing-Kit-LC* (Epicentre Technologies) durchgeführt. Dieser Kit enthielt sowohl den *Sequencing-Buffer*, das Enzym (*SequiTherm-Exel-II-DNA-Polymerase*), die Stopmixe als auch den *Stop-loading-Buffer*.

Die Herstellung eines **Master-Mixes** erfolgte:

	<i>Stammlösung</i>	<i>Endkonzentration</i>	
DNA			7,8 µl
<i>Sequencing Buffer</i>	3,5 x	1,5 x	7,2 µl
Primer (*E2 bzw. *T1)	1 µM	0,06 x	1,0 µl
<i>SequiTherm-Exel-II-DNA-Polymerase</i>	5 U/µl	0,3 U/µl	1,0 µl

In einer Mikrotiterplatte (Biozym) erfolgte nun die Reaktion mit den Stopmixen (modifizierte Nukleotide), dabei wurden je 2 µl A-, C-, G-, T-Stopmix und 4 µl des Master-Mixes vorgelegt.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen gefahren:

95 °C für 3 min	} 29 Cyclen
95 °C für 30 sec	
60 °C für 30 sec	
70 °C für 60 sec	
70 °C für 5 min	

Nach der PCR wurden die DNA-Proben im Verhältnis 2 + 1 mit dem *Stop-loading-Buffer* gemischt und für 3 min bei 80 °C denaturiert. Unmittelbar danach erfolgte das Auftragen der Proben auf dem Sequenziergel, und die Analyse wurde mit dem LI-COR (MWG Biotech) nach Standardbedingungen durchgeführt. Eine automatische Auswertung des Bandenmusters erfolgte.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit der NCBI-Datenbank (-*edb7*) verglichen.

2.5 Klassische Methoden der Bänderungs-Zytogenetik

Als klassische Methoden der Zytogenetik werden Bänderungsverfahren und spezifische Färbemethoden für Chromosomen bezeichnet. 1968 gelang es Dr. Lore Zech erstmals, eine individuelle Unterscheidung der Chromosomen durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Quinacrin (Q-Bänderung) zu ermöglichen (Caspersson *et al.*, 1968, 1970a, 1970b).

Verwendete Reagenzien:

Bacto-Trypsin-Lösung

Bacto-Trypsin-Ampulle (DIFCO Laboratories GmbH) mit 10 ml *Aqua ad* lösen und Aliquots (0,5 ml) herstellen
→ bei -20 °C lagern

0,5 ml gelöstes Bacto-Trypsin in 100 ml PBS-Dulbecco (Biochrom AG) geben
auf 37 °C vorwärmen

Giemsa-Farbstofflösung (Merck)

10 % Gebrauchslösung mit certiPur-Puffer (pH 6,88) (Merck) herstellen

Salzsäure (HCl) (Merck)

0,2 M Lösung herstellen

Bariumhydroxidlösung [Ba(OH)₂] (Merck)

5 % Lösung herstellen
durch einen Faltenfilter in Glasküvette filtrieren

2x SSC

17,5 g Natriumchlorid (NaCl) (Merck)
+ 8,8 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O) (Merck)
add 1000 ml *Aqua dest.*

Colloidalentwickler-Lösung

2 g Gelatine (gepulvert) (Merck) in 100 ml *Aqua dest.* lösen
dazu 1 ml konzentrierte Ameisensäure p.a. (HCOOH) (Merck) geben

wässrige Silbernitratlösung

4 g Silbernitrat (AgNO₃) (Merck) in 8 ml *Aqua dest.* lösen
→ Lösung in geschlossener dunkler Glasflasche aufbewahren

2.5.1 GTG-Bandentechnik

Die GTG-Bandentechnik (= *G-bands by Trypsin using Giemsa*) ist heute eine der gebräuchlichsten Methoden, um Chromosomen darzustellen und so eine numerische und strukturelle Charakterisierung zu ermöglichen (Seabright *et al.*, 1971).

Diese Färbemethode wird sowohl für Lymphozytenpräparate und Amnionzellen als auch für die Darstellung von Knochenmark-Chromosomen verwendet.

Zur Bänderung wurden OT-Präparate verwendet, die wie unter 2.1.2. hergestellt wurden.

Die OTs inkubierten für 19 s in der Bacto-Trypsin-Lösung; nach einem Spülschritt in PBS-Puffer schloß sich die Färbung für 9 min in der Giemsa-Gebrauchslösung an. Nach erneutem Spülen und Trocknen standen die Präparate einer mikroskopischen Beurteilung zur Verfügung.

2.5.2 CBG-Färbung

Die C-Banden-Technik (*C-Banding using Giemsa*) erlaubt die Anfärbung des zentromernahen Heterochromatins aller Chromosomen (Arrighi und Hsu, 1971), besonders deutlich wird dies am perizentrischen Heterochromatinblock der Chromosomen 1, 9, 16 sowie am distalen Heterochromatinblock des Y-Chromosoms.

Eingesetzt wird diese Färbung zur Abklärung perizentrischer Inversionen, Polymorphismen der Heterochromatinregionen, bei Vorliegen von kleinen Markerchromosomen und bei Verdacht auf Vorliegen eines dizentrischen Chromosoms.

Gealterte Präparate wurden bei RT für 1 h in eine 0,2 M HCl-Lösung gestellt. Nach dem Spülen mit *Aqua dest.* erfolgte eine Inkubation für 7 min in einer 5 % Bariumhydroxid-Lösung. Der entstandene weiße Niederschlag auf den OTs wurde durch gründliches Spülen entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der OTs für 1 h in 2x SSC bei 60 °C in einem Wasserbad. Nach erneutem Spülen und Trocknen wurden die OTs für 12 - 15 min in einer Giemsa-Lösung gefärbt und standen danach der mikroskopischen Beurteilung zur Verfügung.

2.5.3 NOR-Färbung

Mit der NOR-Technik ist es möglich, die Nukleolus-organisierenden-Regionen, die in den akrozentrischen Chromosomen, also Chromosomen 13 - 15, 21 und 22, zu finden sind, darzustellen (Bloom und Goodpasture, 1976). Verschiedene Proteine des Nukleolus, z. B. das Nukleolin, reagieren dabei präferentiell mit Silbernitrat und werden dadurch angefärbt.

Diese Färbetechnik wird eingesetzt, um Satellitenassoziationen sichtbar zu machen, beim Nachweis Robertsonscher Translokationen und beim Vorliegen kleiner Markerchromosomen.

Zur Färbung wurden 2 Tropfen des Colloidaleentwicklers und 4 Tropfen der Silbernitratlösung gemischt, auf den OT gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und für 2 min auf der Heizplatte bei 70 °C inkubiert. Nach einer Spülung erfolgte das Gegenfärben mit einer 10 % Giemsa-Lösung für ca. 3 - 5 s. Eine mikroskopische Beurteilung schloß sich an.

2.6 Molekularzytogenetische Techniken

2.6.1 DNA-Fällung der Sonden

Verwendete Reagenzien:

3 M Natriumacetat

24,6 g Natriumacetat (CH_3COONa , wasserfrei) (Sigma)

add 100 ml *Aqua dest.*

pH 5,2 mit Eisessig (Merck) einstellen

Dextransulfat (DS) (= Hybridisierungspuffer)

2 g Dextransulfat (Sigma)

2 ml 20x SSC (Gibco)

2 ml 0,5 M Natriumphosphat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$) (Merck)

5 ml deionisiertes Formamid (ICN Biomedicals)

add 10 ml mit *Aqua dest.*

→ bei 70 °C lösen (ca. 3 h)

Nach der **Markierungs-PCR** bzw. **Nick-Translation** erfolgte die Fällung der DNA-Sonden.

Die *E. coli*-tRNA (Roche) wirkte dabei als Träger-DNA. Je nach Fragestellung wurden markierte Einzelbanken gefällt, für die Herstellung der Multicolor-Banding-Sondenmixe wurden aber auch mehrere Einzelbanken zusammen in einem Ansatz gefällt. Gleiches traf für die Herstellung von M-FISH-Sondensets und Sub-Zentromer-Sets zu.

Bei kleinen Voluminas hat es sich als günstig erwiesen, das Volumen des Ansatzes durch Zugabe von *Aqua dest.* vor der Fällung zu erhöhen. Die markierten DNA-Sonden wurden mit 100 µg tRNA, 3 M Natriumacetat (dabei wurde die 0,1 fache Menge des Gesamtvolumens eingesetzt) und 2,5 Volumina EtOH_{abs} versetzt und für mindestens 15 min bei -70 bis -80 °C gefällt. Anschließend zentrifugierten die Proben 15 min bei mindestens 10000 U/min und 4 °C. Bei einigen Sonden wurde das Pellet anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, und nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Überstandes erfolgte die Trocknung in einer Vakuum Zentrifuge (Speed Vac, Savant) oder bei 60 °C im Trockenschrank (Hereus).

Das Pellet wurde danach in 25 - 45 µl DS (abhängig von Art der Sonde) resuspendiert.

Die markierten DNA-Sonden lagerten bei -20 °C.

Die markierten Banken (Tumor-DNA bzw. „pathologische“ DNA und Normal-DNA), die in der **CGH-Analyse** verwendet wurden, wurden zusammen in einem Ansatz gefällt und somit komplett für eine Hybridisierung eingesetzt. Um ein vollständiges Abblocken repetitiver Sequenzen zu erzielen, war die Zugabe von 50 – 100 µl COT-1-DNA (Roche) notwendig; dabei konnte auf die Zugabe von tRNA als Träger-DNA verzichtet werden. Das Pellet wurde dann mit 12 µl DS resuspendiert.

2.6.2 Lösungen und verwendete Detektionssysteme

20x SSC (Gibco)

enthält 3,0 M Natriumchlorid + 0,3 M Natriumcitrat

2x SSC

100 ml 20x SSC
add 1 l *Aqua dest.*
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

4x SSCT

200 ml 20x SSC
add 1 l *Aqua dest.*
+ 250 µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigma) = 0,05 %
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

SSCTM

0,25 g fettfreie Trockenmilch (Marvel) in 5 ml 4x SSCT lösen
bei 1500 U/min zentrifugieren
oberste Schicht entfernen (enthält noch ungelöste Milchpartikel)

1x PBS

9,55 g/l PBS Dulbecco (Biochrom AG)
in *Aqua dest.*

RNaseA-Lösung (Roche)

10 mg RNase in 1 ml 2x SSC lösen
→ Lösung erfolgte bei 100 °C für 10 min

Formaldehydlösung (ROTH)

Rotipuran ≥ 37 %
Verdünnung mit 1x PBS (3 + 100)

Pepsin-Lösung

10 mM Salzsäure (HCl)
→ 95 ml *Aqua dest.* + 5 ml 0,2 n HCl bei 37 °C vorwärmen
500 µl Pepsin-Stocklösung (20 mg/ml in *Aqua dest.*) (Sigma) zugeben

Postfixations-Lösung

1 % Paraformaldehyd-Lösung gelöst in 1x PBS mit 50 mM MgCl₂
→ 500 µl Paraformaldehyd + 450 µl 1x PBS + 50 µl MgCl₂

50 %ige Formamidlösung

500 ml Formamid (Merck)
100 ml 20x SSC
add 1 l *Aqua dest.*
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

70 %ige Formamid-Denaturierungslösung

70 ml Formamid (Merck)
10 ml 20x SSC
add 100 ml *Aqua dest.*
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

COT-1-DNA (100 µg)

25 µl COT-1-DNA (1 mg/ml) (Roche) mit doppeltem Volumen EtOH_{abs} versetzen,
vollständig eintrocknen (Speed Vac, Savant) und bei -20 °C lagern
→ analog wurden 2, 5 bzw. 10 µg COT-1-DNA aliquotiert

DAPI/Antifade

- 0,2 - 0,25 % 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (Stocklösung: 50 µg/ml) (Sigma)
mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) ansetzen
→ bei 4 °C lichtgeschützt lagern

Detektionssysteme

Die lyophilisierten, an Antikörper gekoppelten Fluorochrome wurden nach Vorschrift des Herstellers gelöst.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung erfolgte eine Verdünnung der Antikörper mit SSCTM. Für jeden Detektionsschritt wurden pro OT 50 - 100 µl Antikörperlösung berechnet. Die Inkubationszeit der Antikörper lag jeweils zwischen 30 - 45 min.

Der Nachweis von Biotin-16-dUTP-markierten Proben bzw. Sonden ist mit folgenden Antikörpern möglich:

- Avidin-Fluorescein-Isothiocyanat (Avidin-FITC) (Vector Laboratories) 1:500
[alternativ kann auch Streptavidin-FITC (Vector Laboratories) verwendet werden]
(in einem 2. und 3. Schritt kann eine Verstärkung des Signals erzielt werden)
→ anti-Avidin-biotinyliert (Vector Laboratories) 1:100
→ Avidin-FITC 1:500
- FluoroLinkCy5-labelled-streptavidin (Amersham) 1:100
(in einem 2. und 3. Schritt kann eine Verstärkung des Signals erzielt werden)
→ biotinyliertes-anti-Avidin-D (in Ziege) (Vector Laboratories) 1:100
→ FluoroLinkCy5-labelled-streptavidin 1:100

Der Nachweis von Digoxigenin-11-dUTP-markierten Proben bzw. Sonden ist mit folgenden Antikörpern möglich:

- anti-Digoxigenin-Cy3 (Dianova) 1:250
- anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche) 1:10
- anti-Digoxigenin-Cy5.5 1:10
[dabei wurde anti-Digoxigenin (100µg, monoklonaler Antikörper, Roche) mit Cy5.5 (FluoroLink Mab Cy5.5 labelling kit, Amersham) gekoppelt und über eine Säule aufgereinigt]
(in einem 2. und 3. Schritt kann eine Verstärkung des Signals erzielt werden)
→ anti-Maus-Digoxigenin (Sheep anti-mouse Ig-Digoxigenin, Chemicon) 1:10
→ anti-Digoxigenin-Cy5.5 1:10

2.6.3 Hybridisierung**2.6.3.1 Objektträger-Vorbehandlung und Denaturierung**

Bei allen Hybridisierungen war es wichtig, möglichst plasmafreie Präparate einzusetzen. Die Chromosomen sind vom Plasma netzförmig umgeben und verhindern so den Zutritt von DNA-Sonde an die chromosomale DNA. Gleichzeitig führt es zu einer stärkeren Hintergrundfärbung. Durch die Behandlung mit Protein-verdauenden Enzymen (Proteinase-K, Trypsin, Pepsin) kann das Plasma von Zellen durchlässiger gemacht werden. Dabei muß beachtet werden, daß starke Protein-zerstörende Behandlungen auch die Zerstörung der Chromosomenmorphologie und ein Ablösen der Chromosomen vom OT nach sich ziehen können. Zur Stabilisierung der Chromosomen wird deshalb eine Nachbehandlung mit Paraformaldehyd durchgeführt.

Chromosomenpräparation humaner Zellen

Die unter 2.1.2 beschriebenen Chromosomenpräparationen wurden zuerst einer Pepsin-Vorbehandlung unterzogen.

Die Pepsin-Lösung wurde bei 37 °C vorgewärmt und die OTs inkubierten 5 min bei dieser Temperatur. Danach wurden die OTs einmal 5 min in 1x PBS bei RT gewaschen. Eine Übersichtung der Präparate erfolgte mit 100 µl Postfixations-Lösung, und eine Inkubation 10 min bei RT schloß sich an. Nun erfolgte wiederum ein Waschschrift in 1x PBS, und die OTs wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % EtOH → 95 % EtOH → EtOH_{abs}) je 3 min dehydriert.

Bei der Hybridisierung muß die chromosomale DNA in Einzelsträngen vorliegen. Um die Chromosomenmorphologie weitgehend zu erhalten, wird die Denaturierung der OTs in einer Formamidlö-

sung durchgeführt. Formamid bewirkt eine Verringerung der Stabilität der DNA-Doppelstränge und die Denaturierungstemperatur kann entsprechend vermindert werden.

Die Denaturierung erfolgte mit 70 %igem Formamid. Dabei wurden 100 µl dieser Lösung auf den OT pipettiert, der mit einem Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt wurde. Auf einer Heizplatte erfolgte eine Inkubation des OT für 3 min bei 73 - 74 °C. Anschließend wurde der OT sofort für 3 min in 70 %igen EtOH (-20 °C) gestellt. Eine weitere Dehydrierung erfolgte in 95 % EtOH und EtOH_{abs} (je 3 min bei RT).

Die auf diese Weise vorbehandelten und getrockneten OTs sollten nicht länger als 2 h vor dem Auftragen der DNA-Sonde lagern.

Chromosomenpräparation der Primaten-Zelllinien

Vor dem Pepsinverdau wurde hier noch eine RNase-Behandlung durchgeführt (Liehr *et al.*, 1995). Die RNase ist eine Pyrimidin-spezifische-Endoribonuklease und somit in der Lage, Einzelstrang-RNA abzubauen. Die OTs wurden für 3 min in eine Küvette mit 2x SSC gestellt, anschließend wurde die RNase-Verdünnung (0,5 µl RNase auf 100 µl 2x SSC) auf den OT pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 37 °C. Es schloß sich eine zweimalige Waschung für je 2 min in 2x SSC und für 2 min in 1x PBS an.

Der Pepsinverdau wurde daran anschließend durchgeführt, allerdings wurden nur 12,5 µl der Pepsinstocklösung in eine 100 ml HCl-Lösung (auf 37 °C temperiert) gegeben. Die Inkubation in der Pepsinlösung betrug 2 min, ein Waschschriff für 2 min in 1x PBS schloß sich an. Eine anschließende Fixierung wurde mit der verdünnten Formaldehydlösung für 10 min durchgeführt. Eine Waschung für 3 min in 1x PBS folgte. Die OTs wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % EtOH → 95 % EtOH → EtOH_{abs}) je 3 min dehydriert.

Die Denaturierung der OTs wurde analog, wie für humane Zellen beschrieben, durchgeführt.

2.6.3.2 Präparation und Denaturierung der DNA-Sonden

Für die Hybridisierung war es notwendig, daß sowohl die chromosomale, als auch die DNA-Sonden einzelsträngig vorlagen (siehe Abb. 1.2: Schema zur FISH).

Die Denaturierung der DNA-Sonden erfolgte ebenfalls durch Einwirkung des organischen Lösungsmittels Formamid, das die thermische Stabilität der doppelsträngigen DNA reduzierte. Die Denaturierung konnte somit bei niedrigerer Temperatur erfolgen. Formamid war in unterschiedlichen Konzentrationen sowohl im selbst hergestellten Hybridisierungspuffer (DS) als auch bei den kommerziell vertriebenen Puffern enthalten, so daß die Denaturierungsprotokolle vom Sondenhersteller modifiziert und angegeben wurden. Im folgenden wurden deshalb die Protokolle in tabellarischer Form zusammengefaßt (siehe Tabelle 2.5).

Um die Signalspezifität der Hybridisierung zu erhöhen, war es erforderlich, die innerhalb der DNA vorkommenden repetitiven Sequenzen abzublocken. Hochrepetitive DNA-Abschnitte bestehen aus hintereinandergeschalteten relativ kurzen Nukleotidsequenzen, die vorallem in den Zentromeren und zentromernahen Bereichen sowie an den Enden (Telomere) der Chromosomen vorkommen. Diese Sequenzen spielen vermutlich eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Chromosomen-Struktur (Knippers, 2001). Ein Absättigen dieser repetitiven Sequenzen erfolgte durch Zugabe von COT-1-DNA, eine Fraktion genomischer DNA, in welcher hochrepetitive Sequenzen (Alu-I-Linie, Kpu-I-Linie) durch eine bestimmte Aufarbeitung angereichert sind (Strachan und Read, 1996).

Die in der Tabelle 2.5 angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf ein Hybridisierungsareal von 24 x 24 mm (entspricht einem halben OT).

Bei den GGO- und HLA-OTs wurde prinzipiell die doppelte Menge an DNA-Sonden eingesetzt, indem auf eine Verdünnung der Sonden mit DS verzichtet wurde.

Ein paralleler Hybridisierungsansatz von OTs mit humanen Metaphasen und von GGO- bzw. HLA-Metaphasen erfolgte, um eine größtmögliche Identität der Hybridisierungs- und Waschbedingungen zu gewährleisten.

Die Denaturierung der Sonden erfolgte jeweils im Thermocycler, je nach Sondentyp standen unterschiedliche Programme zur Verfügung.

Tabelle 2.5
Präparation und Denaturierung der unterschiedlichen DNA-Sonden

Sonden	Firma	Präparation der Sonden	Denaturierung der Sonden
- MCB - wcp / pcp - YAC - BAC	selbstmarkierte Sonden	4 µl Sonde bzw. Sonden-Mix + 6 µl DS auf 5 – 10 µg COT-1-DNA <i>Hybridisierung von 2 Sonden in einem Ansatz: je 4 µl Sonde + 2 µl DS</i>	5 min bei 72 °C 2 min bei 4 °C 30 min bei 37 °C = Programm: Prehyb
- M-FISH	selbstmarkierte Sonden	4 µl Sonde + 6 µl DS auf 25 µg COT-1-DNA	Programm: Prehyb
- Micro-CGH	selbstmarkierte Sonden	12 µl Sonde (enthält bereits COT-1)	Programm: Prehyb
- subcen-Mix - subtel	selbstmarkierte Sonden	4 µl Sonde(-nmix) + 2 µl DS auf 10 µg COT-1 1 µl CEP-Sonde (VYSIS/ABBOTT) + 1 µl Aqua dest. + 3 µl CEP-Puffer	subcen -mix: Programm: Prehyb CEP- Sonden: 5 min bei 72 °C anschließend 4 °C Programm: Direkt <i>vor dem Auftragen beide Ansätze vereinigen</i>
- cenM-FISH	selbstmarkierte Sonden	5 µl DS in Ansatz 1 (= Midi 12, enthält bereits COT-1-DNA) 5 µl DS in Ansatz 2 (= markierte cep-Sonden, ohne COT-1-DNA)	Ansatz 1: 5 min bei 72 °C 2min bei 4 °C 10 min bei 37 °C = Programm: Prehyb-10min Ansatz 2: Programm: Direkt <i>vor dem Auftragen beide Ansätze vereinigen</i>
- acrocenM-FISH	selbstmarkierte Sonden	5 µl DS in Ansatz 1 (= midi 54, enthält bereits COT-1-DNA) 5 µl DS in Ansatz 2 (= markierte cep- und NOR-Sonden, ohne COT-1-DNA)	Ansatz 1: Programm: Prehyb-10min Ansatz 2: Programm: Direkt <i>vor dem Auftragen beide Ansätze vereinigen</i>
- LSI (lokusspezi- fische Sonden)	Vysis/ ABBOTT	1 µl LSI Sonde + 2 µl Wasser + 7 µl LSI-Puffer	Programm: Direkt
- CEP	Vysis/ ABBOTT	1 µl CEP Sonde + 2 µl Wasser + 7 µl CEP-Puffer	Programm: Direkt
- Aneuvision (LSI und CEP für UFW)	Vysis/ ABBOTT	8 µl Sonde entnehmen	keine Denaturierung <i>Sonde direkt auf OT pipettieren</i>
- CEP	Q-BIOgene	2 µl Sonde + 8 µl Hybritpuffer	Programm: Direkt
- subtel + CEP	Q-BIOgene	2 µl subtel-Sonde + 1-2 µl CEP-Sonde + 7 µl Hybritpuffer	Programm: Direkt

2.6.3.3 Aufbringen der DNA-Sonden auf den Objektträger

Nach erfolgter Denaturierung der DNA-Sonden wurden diese auf den denaturierten OT pipettiert; entsprechend der Menge an DNA-Sonden wurde das Hybridisierungsareal mit einem Deckglas (in der Regel 24 x 24 mm) luftblasenfrei abgedeckt. Eine Abdichtung der Ränder mit Fixogum (Rupper Cement, Marabu) schloß sich an.

Die Hybridisierungen erfolgten für 12 - 72 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer (siehe Tab. 2.6).

2.6.4 Detektion

Die Wasch- und nachfolgenden Detektionsschritte waren abhängig von den eingesetzten DNA-Sonden und wurden ebenfalls tabellarisch (siehe Tab. 2.6) zusammengestellt.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte in einigen Hybridisierungen nach der Waschung erst ein Blocken mit Trockenmilch (SSCTM) für ca. 15 min bei 37 °C; anschließend wurde der OT kurz in 4x SSCT (bei RT) gespült.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Detektionssysteme wurden bereits unter 2.6.2. beschrieben.

Nach Inkubation der jeweiligen Antikörper erfolgte eine Waschung der OTs 2 – 3 x für je 5 min in 4x SSCT auf einem Schüttler. Nach dem letzten Detektionsschritt schloß sich eine Waschung in 1x PBS für 5 min an. Anschließend wurden die OTs entweder in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert oder für kurze Zeit in *Aqua dest.* gestellt, möglichst schnell getrocknet und abschließend mit DAPI/Antifade (ca. 20 µl) unter Verwendung eines Deckglases (24 x 60 mm) eingedeckt.

2.6.5 Auswertung

Die Präparate wurden an einem Axioplan 2 Mikroskop mit einem 6-Filterrad (Zeiss, Jena) in Kombination mit einer IMAC-CCD-Videokamera mit *On-chip*-Integration (Compulog, Böblingen) aufgenommen. Die Filterblöcke waren austauschbar und so war, entsprechend der eingesetzten Fluorochrome, wahlweise die Aufnahme von FITC, SG, SO, TR, Cy3, Cy5, Cy5.5, SA, DEAC und DAPI möglich.

Für die Auswertung und Dokumentation der Bilder stand die ISIS-Software (MetaSystems, Altlussheim) zur Verfügung. Den Grauwerten der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe wurde vom Programm eine bestimmte Farbe zugeordnet. Diese Einzelbilder wurden in verschiedenen Kanälen gespeichert und konnten somit einzeln bearbeitet werden. Das Programm enthielt unter anderem die Möglichkeit, Karyogramme zu erstellen, die Einzelbilder der 6 Farbkanäle in einem Mischbild zu überlagern und Falschfarben entsprechend den Fluorochromkombinationen darzustellen (siehe Handbuch zum ISIS-Programm). Eine Zuordnung von Falschfarben war sowohl bei M-FISH- als auch bei MCB-Auswertungen erwünscht.

Das Erstellen von Farbklassifikatoren (= Falschfarb-Dateien) war für jeden einzelnen MCB-Mix notwendig; dabei wurden entlang des Chromosoms entsprechend den unterschiedlichen Fluorochromkombinationen bestimmte „künstliche“ Farben (= Falschfarben) zugeordnet. Die Anzahl der zu verteilenden Falschfarben konnte vor Erstellen des Farbklassifikators, abhängig von der Software-Version, innerhalb bestimmter Zahlenwerte frei gewählt werden (siehe Handbuch zum ISIS-Programm).

Die Falschfarb-Dateien wurden an Hybridisierungsbildern normaler Metaphaseplatten mit einer Auflösung von ≥ 400 Banden pro haploiden Chromosomensatz erstellt. Als geeignet wurde ein Farb-Klassifikator befunden, wenn die Reproduzierbarkeit der Falschfarben an mindestens 5 weiteren Chromosomenpaaren ohne Aberrationen gewährleistet war. Dabei konnten nur die Aufnahmen miteinander verglichen werden, die nach Hybridisierung mit identischen Sonden-Mixen und gleichen Hybridisierungsbedingungen aufgenommen wurden. Bei einzelnen Analysen chromosomaler Aberrationen war es notwendig, die Anzahl der Falschfarb-Banden zu verändern. Sogenannte Fall-spezifische-Farb-Klassifikatoren wurden erstellt.

Es hat sich insgesamt als günstig herausgestellt, bei Auswertung der MCB-Bilder sowohl die Falschfarben als auch die Fluorochrom-Profilkurven zu beurteilen.

Tabelle 2.6

Hybridisierungszeiten, Wasch- und Detektionsprotokolle der unterschiedlichen Sonden

Sonden	Firma	Opt. Hybridisierungs-dauer	Waschprotokolle	Detektion
- wcp / pcp	selbst-markierte Sonden	16 h	2 min/65 - 68 °C in 0,4x SSC 1 min/RT in 4x SSCT	- Blocken - Detektion: 30 - 40min
- YAC - BAC		24 - 48 h	3x 5 min/42 °C in 50 % FA 3x 5 min/42 °C in 2x SSC kurz in 4x SSCTM/RT	- Blocken - Detektion: 30 - 40min
- MCB		16 - 24 h	3x 5 min/42 °C in 50 % FA 3x 5 min/42 °C in 2x SSC kurz in 4x SSCT/RT <u>alternativ:</u> 5 min/65 - 67 °C in 1x SSC 5 min/RT in 4x SSCT	- Blocken - Detektion: 30 - 40min
- M-FISH		24 - 48 h	3x 5 min/42 °C in 50 % FA 3x 5 min/42 °C in 2x SSC kurz in 4x SSCT/RT <u>alternativ:</u> 5 min/65 - 67 °C in 1x SSC 5 min/RT in 4x SSCT	- Blocken - Detektion: 30 - 40min
- Micro-CGH		48 - 72 h	3x 5 min/42 °C in 50 % FA 3x 5 min/42 °C in 2x SSC kurz in 4x SSCT/RT <u>alternativ:</u> 5 min/65 - 67 °C in 1x SSC 5min/RT in 4x SSCT	- Blocken - Detektion: 30 - 40min
- subcen-Mix - subtel		16 h	3x 5 min/42 °C in 50 % FA 3x 5 min/42 °C in 2x SSC kurz in 4x SSCT/RT	- Blocken - Detektion: 30 - 40min
- cenM-FISH - acrocenM-FISH		12 - 16 h	2 min/68 - 70 °C in 0,4x SSC 1 min/RT in 4x SSCT	- ohne Blocken - Detektion: 30 - 40min
- LSI - Aneuvision	Vysis/ ABBOTT	12 - 16 h	2 min/56 °C in 0,4x SSC 1 min/RT in 4x SSCT	- <i>keine Detektion erforderlich</i>
- CEP	Vysis/ ABBOTT	12 - 16 h	2 min/68 °C in 0,4x SSC 1min/RT in 4x SSCT	- <i>keine Detektion erforderlich</i>
- CEP - subtel + CEP	Q-BIO-gene	12 - 16 h	2 min/65 - 68 °C in 0,4x SSC 1min/RT in 4x SSCT	- <i>keine Detektion erforderlich</i>

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung neuer molekularzytogenetischer Techniken

Die Charakterisierung konstitutioneller und erworbener Karyotypveränderungen und Aussagen zu den involvierten Bruchpunkten sind mit konventionellen Bänderungstechniken bisher in vielen Fällen nicht mit ausreichend hoher Auflösung möglich. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zunächst neue molekularzytogenetische Ansätze bzw. Sondenmixe entwickelt, durch die eine genom-umspannende DNA-basierende Bänderung der Chromosomen erreicht werden sollte.

Am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, wurde das *Multicolor-Banding* (MCB), das auf überlappenden regionspezifischen Mikrosezierungsbanken basiert, am Beispiel von Chromosom 5 entwickelt (Chudoba *et al.*, 1999). Nach der Markierung der 7 Mikrosezierungs-Banken mit 5 unterschiedlichen Fluorochromen erfolgte die Hybridisierung des Sondenmixes auf Metaphasechromosomen, und die Aufnahme mit einer speziellen Software (ISIS, MetaSystems, Altlußheim) schloß sich an. Die Fluoreszenz-Intensitätsprofile entlang der jeweiligen Chromosomen wurden mittels der ISIS-Software in Falschfarben übersetzt, dadurch war eine Beurteilung der Chromosomen möglich.

Diese „Farb-Bänderung“ erlaubt eine Charakterisierung von chromosomalen Aberrationen mit einer hohen Reproduzierbarkeit – weitgehend unabhängig vom Kondensationszustand der Chromosomen. Somit ist die Methode der Multicolor-Bänderung prinzipiell geeignet, nach GTG-Bänderung nicht näher beschreibbare Aberrationen bezüglich der chromosomalen Bruchpunkte aufzuklären und zu charakterisieren, sowie bisher kryptische chromosomale Rearrangements zu identifizieren.

Eine gedankliche Weiterentwicklung der Multicolor-Bänderung war ein MCB auf der Basis von lokusspezifischen Sonden (z. B. YAC- oder BAC-Sonden), die zu einem YAC/BAC-basierenden MCB-Mix zusammengestellt werden sollten. Durch Einsatz von lokusspezifischen Sonden wurde eine Charakterisierung chromosomaler Bruchpunkte mit einer noch höheren Auflösung erwartet, da diese Sonden wesentlich kleinere DNA-Abschnitte, verglichen mit Mikrosezierungsbanken, markieren. Weiterhin war theoretisch durch Einsatz lokusspezifischer Sonden eine Charakterisierung der Bruchpunkte durch Bruchpunkt-überspannende Klone gegeben.

3.1.1 Multicolor-Bänderung der Chromosomen 2, 13 und 22 mit einem auf YAC- und BAC-Banken basierendem Sondenmix (YAC/BAC-MCB)

Mittels lokusspezifischer YAC und/oder BAC-Sonden wurden exemplarisch MCB-Sondenmixe für die menschlichen Chromosomen 2 (großes Chromosom), 13 (mittelgroßes, akrozentrisches Chromosom) und 22 (kleines akrozentrisches Chromosom) entwickelt.

Die hierzu verwendeten Sonden für die Chromosomen 2 und 22 sind bei Liehr *et al.*, 2002a zusammengestellt, die YAC-Sonden für Chromosom 13 sind im Kapitel 2 dieser Arbeit (Material und Methoden) in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Am Beispiel von Chromosom 13 wird im folgenden die Strategie und dazu notwendigen Arbeitsschritte zur Etablierung des YAC/BAC-MCB erläutert (Liehr *et al.*, 2002a).

Die Etablierung des Sondenmixes für Chromosom 13 war Teil der vorliegenden Arbeit. Die Chromosomen 2 und 22 wurden parallel von A. Weise und H. Starke bearbeitet.

82 YAC-Banken wurden entsprechend ihrer molekulargenetisch kartierten Position zu 5 DNA-Pools zusammengefaßt (Tab. 8.1 im Anhang, Abb. 3.1). Es sollte durch Anpassung der DNA-Konzentrationen der eingesetzten Sonden eine Gaußsche Verteilung (Abb. 3.1 A) der resultierenden Profile mit entsprechenden Überlappungsbereichen erzielt werden, d. h., die Sonden, die in der Mitte des Profils liegen, wurden in einer höheren Konzentration zur Markierung eingesetzt, die Sonden in den Randbereichen hingegen in einer niedrigeren Konzentration. Nach der Hybridisierung stellte sich heraus, daß die molekulargenetische Kartierung der YAC-Banken nicht mit der molekularzytogenetischen Lokalisation

übereinstimmte (Abb. 3.1 B). Deshalb war es erforderlich, alle Sonden in Einzelhybridisierungen auf Metaphasechromosomen nachzukartieren. Die durch eine erneute Hybridisierung erzielten Ergebnisse waren allerdings nicht zufriedenstellend, wie in Abb. 3.1 C in den ungleichmäßigen Profilkurven zu erkennen ist.

Da das YAC-MCB eine zu inhomogene Färbung der einzelnen Chromosomenregionen produzierte, wurde überprüft, inwieweit eine Abdeckung des gesamten Chromosoms durch die zur Verfügung stehenden YAC-Banken überhaupt gegeben ist. Es stellte sich nach Hybridisierung aller verwendeter lokusspezifischer Sonden in einem Ansatz heraus, daß nur eine unvollständige Abdeckung des Chromosoms 13 erzielt werden konnte (Abb. 3.1 D). So waren weder lokusspezifische Sonden für die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen verfügbar, noch gab es YAC oder BAC-Sonden für die zentromernähe Region des Chromosoms 13. Im langen Arm des Chromosoms 13 lagen 5 zusätzliche Regionen vor, die durch die eingesetzten Klone nur ungenügend abgedeckt wurden: 13q12→q13, 13q21.1, 13q21.3, 13q31.1, 13q34.

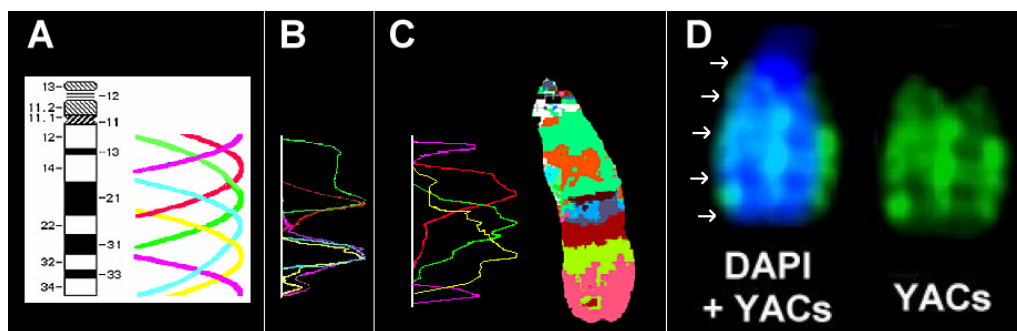


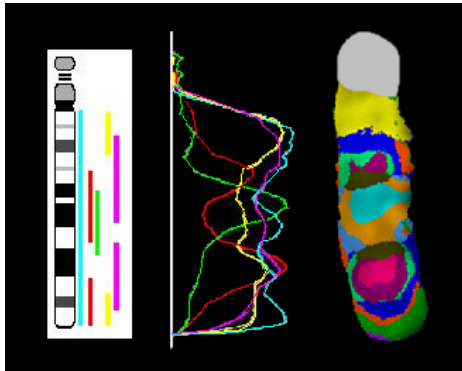
Abb. 3.1

Entwicklungsschritte des YAC/BAC-MCB für Chromosom 13

(A) Ideal-Profil, die einer annähernd Gaußschen Verteilung entsprechen und aus 5 überlappenden DNA-Pools bestehen, sind skizziert. (B) Nach der ersten Hybridisierung der YAC-Klone (entsprechend ihrer genetischen Kartierung in 5 DNA-Pools markiert) wurden ungleichmäßige Profilkurven erhalten. (C) Nach erfolgter molekularzytogenetischer Kartierung der Einzel-YAC-Sonden wurden die YAC-Klone erneut in 5 DNA-Pools zusammengestellt und markiert. Hier sind die resultierenden Fluoreszenzprofile und die Falschfarben dargestellt. (D) Alle lokusspezifischen Sonden wurden in einem Ansatz markiert und hybridisiert (Fluoreszenzsignale sind in grün dargestellt). Die Pfeile kennzeichnen die nur unvollständig abgedeckten Bereiche auf dem Chromosom.

Damit auch in diesen Bereichen eine Abdeckung und somit Falschfarbzuordnung ermöglicht werden konnte, wurde ein neuer Ansatz gewählt. Es erfolgte die Zusammenstellung der verfügbaren YAC-Banken zu 7 regionspezifischen DNA-Pools (Tab. 8.2 im Anhang, Abb. 3.2). Dabei wurde gleichzeitig noch eine wcp-Sonde für Chromosom 13 eingesetzt, um die durch die YAC-Pools nicht gefärbten Regionen abzudecken. Mit diesem Ansatz konnten 18 Falschfarbbanden erzielt werden, 8 davon waren jeweils zweimal vorhanden, und es ließ sich nur eine sehr unregelmäßige Bandenabfolge erzielen (Abb. 3.2).

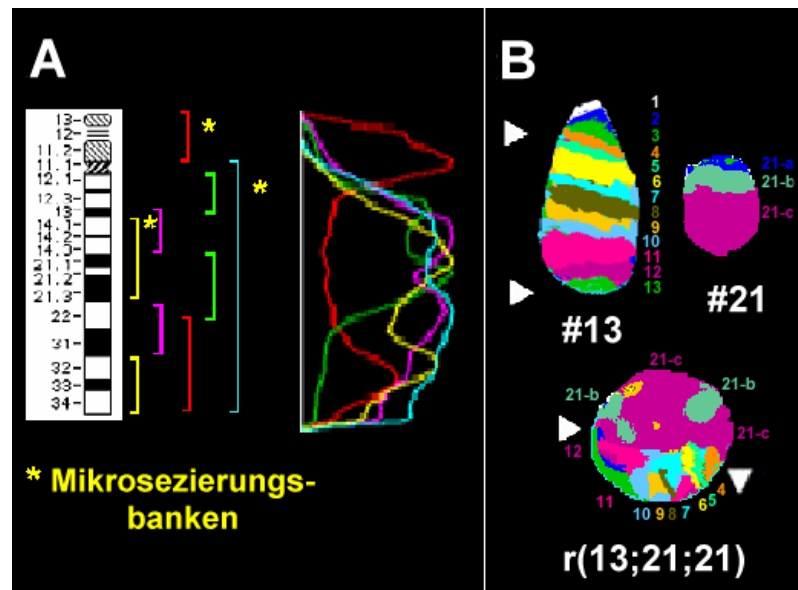
Daraufhin wurde eine dritte Sondenkombination getestet. Die verfügbaren YAC-Banken wurden zu 6 DNA-Pools zusammengefaßt und markiert (Tab. 8.3 im Anhang), weiterhin wurde eine wcp13-Sonde sowie eine spezifische Mikrosezierungssonde für die kurzen Arme aller akrozentrischen Chromosomen (midi54) und eine weitere Mikrosezierungssonde für die chromosomale Region 13q14 - 21 eingesetzt (Abb. 3.3 A). Dadurch konnten die Lücken auf dem Chromosom, die sich nicht komplett durch die YAC-Sonden abdecken ließen, schließen und es war möglich, 13 klar erkennbare und regelmäßige Falschfarbbanden darzustellen (Abb. 3.3 B).

**Abb. 3.2****Verbessertes YAC-MCB für Chromosom 13 durch Zusatz einer wcp #13-Sonde**

7 YAC-Pools wurden entsprechend dem Schema (links im Bild) markiert, die Fluoreszenzprofile (mitte) und die Falschfarben (rechts) sind dargestellt.

Abb. 3.3**Optimiertes MCB für Chromosom 13 aus YAC- und Mikrosezierungsbanken und aufgeklärte Struktur und Lokalisation der Bruchpunkte eines Ringchromosoms (Fall 12)**

(A) Das Markierungsschema und die Fluoreszenzprofile sind dargestellt. (B) Diese YAC-MCB-Sondenkombination wurde zusammen mit einer wcp-Sonde für #21 im Fall 12 hybridisiert. Nach dem Einsatz der Falschfarbfunktion für #13 ergaben sich



auch für #21 Falschfarben, da neben der wcp-Sonde auch die midi 54 im p-Arm hybridisiert. Die Bruchpunkte für Chromosom 13 sind durch Pfeilspitzen markiert und die Falschfarben für Chromosom 13 sind fortlaufend mit 1 bis 13 numeriert, für Chromosom 21 mit 21-1 bis 21-3.

Ein MCB-Sondenmix basierend ausschließlich auf YAC und/oder BAC-Sonden erbrachte nicht die im Vorfeld erhofften Vorteile. Regelmäßige und reproduzierbare Falschfarben konnten erst nach dem kombinierten Einsatz von YAC-Pools und Mikrosezierungsbanken erzielt werden.

Ähnliche Ergebnisse mit dem YAC/BAC-MCB wurden parallel für Chromosomen 2 und 22 erzielt (siehe Liehr *et al.*, 2002a).

Das neu etablierte, auf YAC- und Mikrosezierungssonden basierende MCB für Chromosom 13 wurde auf Metaphaseplatten mit tumorspezifischen und konstitutionellen Aberrationen hybridisiert (Tab. 8.4 im Anhang).

Exemplarisch werden hier die Fälle 3 und 12 näher beschrieben.

Im Fall 3 wurden Lymphozyten bei einem Neugeborenen mit auffälliger Klinik untersucht. Es wurde eine Translokation der Chromosomen 5 und 13 nach GTG-Bänderung nachgewiesen. Eine Überprüfung der Bruchpunkte erfolgte in einer kombinierten Hybridisierung der YAC-MCB #13-Sonde mit dem MCB für Chromosom 5 (Abb. 3.4). Die nach konventioneller Bänderung beschriebenen Bruchpunkte konnten nach Einsatz der MCB-Sonden bestätigt werden.

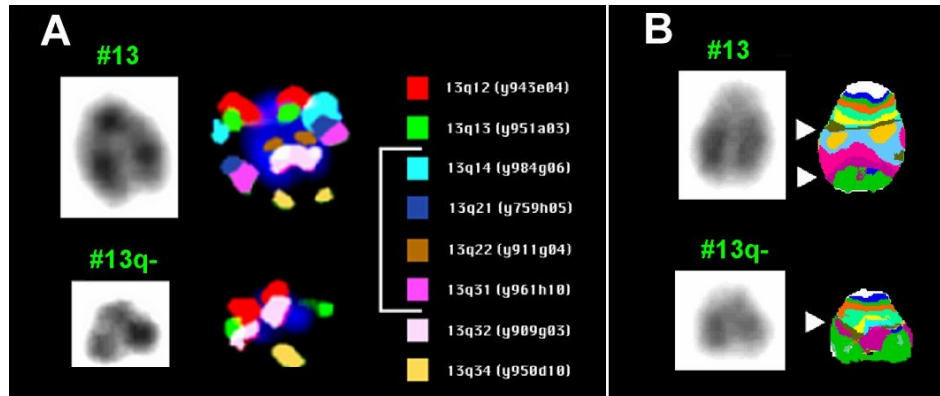


Abb. 3.5

Auflösungsvermögen der *Chromosome-bar-code*-Technik verglichen mit dem YAC-MCB #13 bei einer del(13) (Fall 10)

(A) Der *Chromosome-bar-code*-Mix für #13 wurde hybridisiert. Links im Bild sind die invertierten DAPI-Aufnahmen, in der Mitte ist die Hybridisierung der lokusspezifischen Sonden und rechts ist sowohl die Farblegende als auch die Lokalisation der Sonden dargestellt. Die Klammer kennzeichnet die fehlenden Sonden. Die Karyotypbeschreibung lautet: ish del (13)(q13 or q14q31 or q32). (B) Der YAC-MCB-Mix für #13 wurde hybridisiert. Die Bruchpunkte sind durch Pfeilspitzen markiert. Eine Präzisierung des Karyotypes konnte vorgenommen werden: ish del(13)(q13q31.3).

3.1.3 Multicolor-Bänderung (MCB) für alle menschlichen Chromosomen basierend auf Mikrosezierungsbanken

Nachdem am Beispiel von Chromosom 5 das Potential des MCB gezeigt werden konnte und ein MCB mit lokusspezifischen Sonden nicht die gewünschten Vorteile brachte, bestand der nächste Arbeitsschritt darin, MCB-Sondenmixe basierend auf Mikrosezierung für alle menschlichen Chromosomen zu entwickeln.

Dazu wurden 138 regionspezifische Mikrosezierungsbanken (rpcp) über den gesamten menschlichen Karyotyp verteilt, hergestellt. Bei der Mikrosezierung der rpcps wurde versucht, die Banken so zu erstellen, daß jeweils eine Überlappung der benachbarten Banken und eine annähernd Gaußsche Verteilung des Fluoreszenzprofils entsteht (Chudoba *et al.*, 1999, Liehr *et al.*, 2002). Pro Chromosom wurden dann im Minimum 3 (z. B. für Chromosom 19, 20, 21, Y) und im Maximum 10 rpcps (z. B. für Chromosom 2) zusammengestellt. Die eingesetzten DNA-Banken wurden anschließend mit 1 - 2 unterschiedlichen Fluorochromen bzw. modifizierten Nukleotiden markiert (siehe Abb. 3.6).

An dieser sehr umfangreichen Arbeit waren außer der Promovierenden noch beteiligt: H. Starke, Prof. Dr. U. Claussen, Dr. V. Trifonov und Dr. N. Rubtsov.

Die nach Zusammenstellung der menschlichen MCB-Mixe etablierten Standard-Farb-Klassifikatoren (siehe auch 2.6.5) ließen eine Auflösung von 400 - 800 Banden pro haploiden Chromosomensatz zu, diese war in den meisten Fällen höher, als nach GTG-Bänderung erzielt werden konnte (Liehr *et al.*, 2002). Der Kondensationszustand der Chromosomen hat dabei kaum Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit der Falschfarb-Banden.

In Abb. 3.7 sind typische Falschfarbmuster aller menschlichen Chromosomen in einem Karyogramm zusammengestellt.

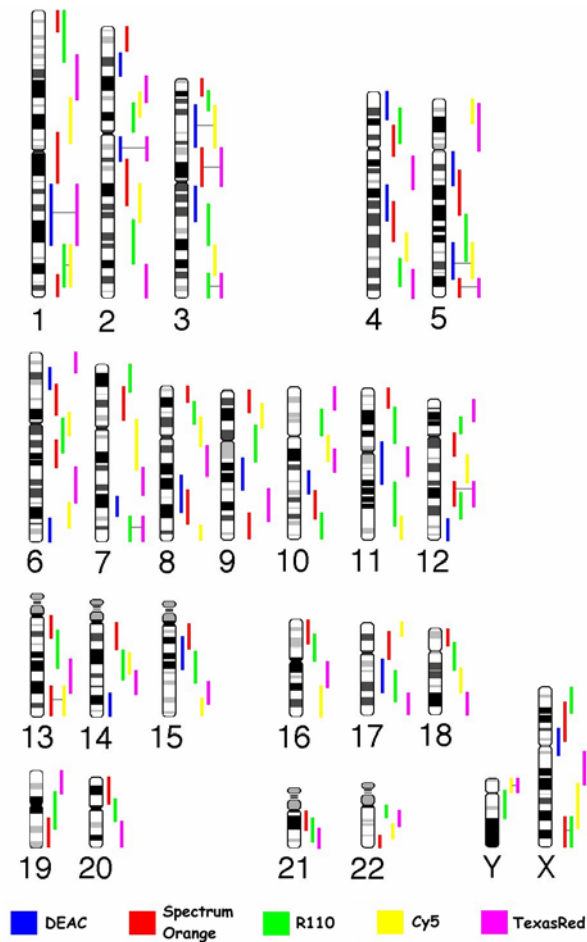


Abb. 3.6
Lokalisation und Markierungsschemata der 138 Mikrosezierungssonden

Sie decken den gesamten menschlichen Karyotyp ab. Mikrosezierungssonden, die gleichzeitig mit 2 Fluorochromen markiert wurden, sind durch einen grauen Balken miteinander verbunden. Eine Auswahl einsetzbarer Fluorochrome ist in der Legende dargestellt.

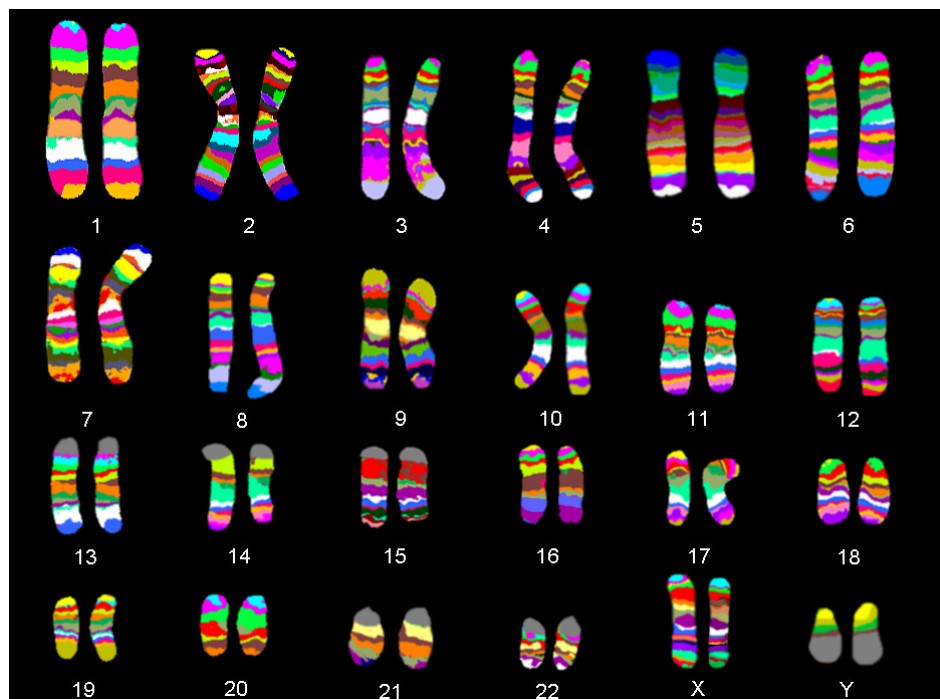


Abb. 3.7
MCB aller 24 menschlichen Chromosomen

In diesem Karyogramm erfolgte eine Zusammenstellung homologer Chromosomenpaare nach entsprechenden Einzelhybridisierungen in der Falschfarbendarstellung.

3.2 Evaluierung der MCB-Methode

3.2.1 Charakterisierung der Bruchpunkte von konstitutionellen und tumorspezifischen Chromosomenaberrationen

Vor dem Einsatz der neu etablierten molekularzytogenetischen Sonden in weiterführenden Studien wurde deren Zuverlässigkeit überprüft.

Dazu wurden unterschiedliche konstitutionelle und tumorspezifische Aberrationstypen untersucht (siehe Tabelle 8.5 im Anhang). So erfolgte eine weiterführende Charakterisierung der Bruchpunktlage an Fällen mit Duplikationen (Fall 13 und 14), mit Deletionen (Fall 15 und 24), mit Inversionen (Fall 16 und 17), mit Translokationen (Fall 18 - 21, 23 und 24) und an Markerchromosomen (Fall 22 und 25). In den Fällen 26 und 27 konnten die komplex veränderten Chromosomen durch verschiedene molekularzytogenetische Techniken aufgeklärt und durch MCB-Analysen im Detail beschrieben werden.

Die Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchungen werden nun beispielhaft an den Fällen 13, 21, 22, 25, 26 und 27 vorgestellt.

MCB im Vergleich zu Micro-CGH und lokusspezifischen Sonden

Fall 13 (Abb. 3.8) wurde unter Berücksichtigung klinischer Aspekte publiziert in Heller *et al.*, 2000a.

Sowohl in Amnionzellen als auch in Lymphozyten der Patientin wurde nach konventioneller GTG-Bänderung ein derivatives Chromosom 9 mit einem vergrößerten Bereich im langen Arm gefunden. Nach der Hybridisierung mit wcp und pcp-Sonden für Chromosom 9 konnte nachgewiesen werden, daß es sich hierbei ausschließlich um Material vom Chromosom 9 handelt. Mit dem MCB-Mix #9 war eine Duplikation im langen Arm des derivativen Chromosoms in der Region 9q22 - q31 nachweisbar, eine Aussage, ob die duplizierte Region invertiert oder in gleicher Richtung vorliegt, konnte nicht getroffen werden (Abb. 3.8 A). Die Technik der *Micro-CGH* (Heller *et al.*, 2000) wurde angewandt. Aus der Zellsuspension der Patientin konnte eine *Micro-CGH*-Analyse mit 15 Kernen durchgeführt werden; dabei wurde der Zugewinn in der Region 9q22 - q31 (rev ish 9q22-q31) sichtbar (Abb. 3.8 C). Eine Präzisierung der Bruchpunkte erfolgte durch den Einsatz verschiedener YAC- und Mikrosezierungssonden (die Lokalisation der spezifischen Sonden ist in Abb. 3.8 B dargestellt). Zwölf YAC-Sonden wurden eingesetzt und ergaben folgende Signalkonstellationen (siehe auch Abb. 3.8 E - G):

- mit den YACs 750c6, 933c05, 957h08 (9q31.2 - 32) war ein spezifisches Signal auf dem derivativen Chromosom nachweisbar,
- die YACs 870b4, 857g10, 933g6, 908f11, 931d9 (9q22 - 31) zeigten 2 Signale,
- und die YACs 806f02, 906g6, 945f5, und 747b3 (9q22.1) ergaben jeweils 3 Signale auf dem verlängerten Chromosom 9.

Aufgrund dieser Daten war festzustellen, daß die Region 9q31.2 - 32 nicht in die Duplikation involviert ist, mit den YAC-Sonden aus der Region 9q22 - q31 aber sehr wohl die Duplikation nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der MCB-Ergebnisse sowie der Signalverteilung und -intensität der YAC-Sonden aus der Region 9q22.1 war eine partielle Trisomie auszuschließen. Das proximale Fluoreszenzsignal war bei allen 4 eingesetzten YAC-Sonden jeweils sehr schwach im Vergleich zu den beiden mehr distal liegenden Signalen. Diese Signalverteilung kann dadurch erklärt werden, daß ein „splitting“ des Signales stattgefunden hat und diese YAC-Sonden somit den proximalen Bruchpunkt in 9q22.1 überspannen. Weitere Mikrosezierungssonden (midi 23: 9p12 - q21.3 und midi 36: 9q13 - q21.1), die proximal vom Bruchpunkt liegen, wurden hybridisiert und zeigten auf dem verlängerten Chromosom jeweils eine normale Signalverteilung. Insgesamt wird somit eine Duplikation von 9q22.1 - 31.1 beschrieben, wobei das duplizierte als auch das regulär vorhandene Fragment invertiert vorliegen.

Zusammenfassend kann das derivative Chromosom 9 folgendermaßen beschrieben werden: dup(9)(pter→q22.1::q31.1→q22.1::q31.1→q22.1::q31.1→qter).

Das MCB-Ergebnis wurde durch *Micro-CGH* bestätigt und konnte durch lokusspezifische FISH-Sonden bezüglich der Bruchpunktlokalisation und Orientierung des duplizierten Fragments präzisiert werden.

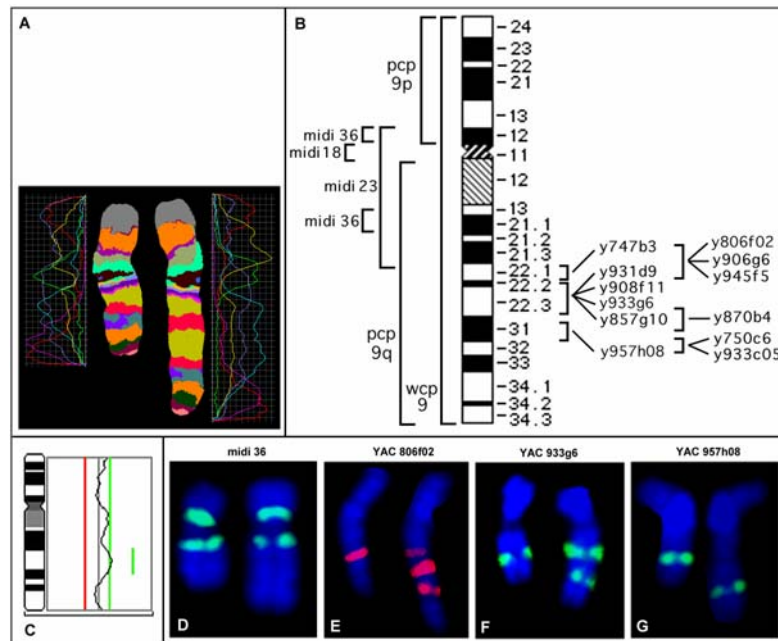


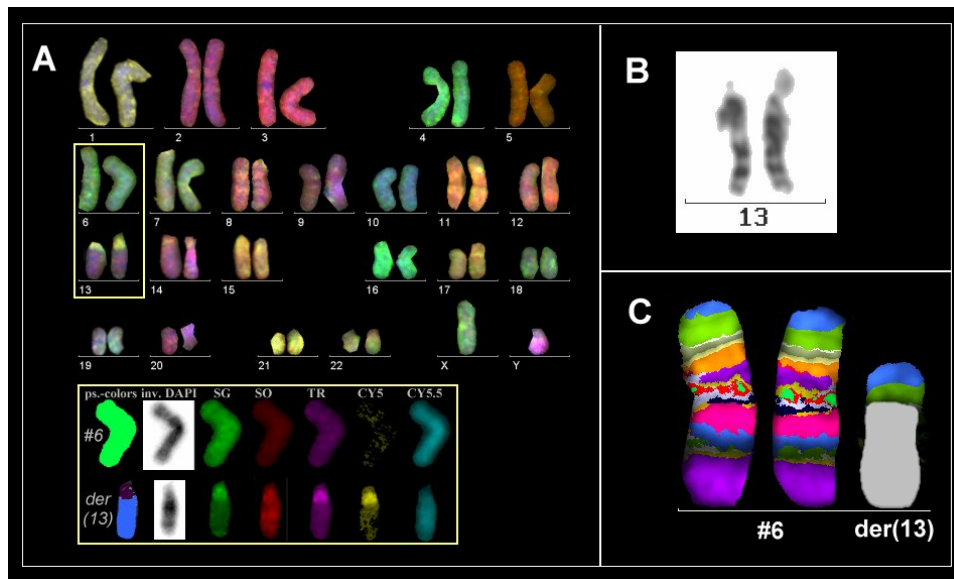
Abb. 3.8

Nachweis einer dup(9) durch MCB und *Micro-CGH* sowie Charakterisierung der Bruchpunkte durch lokusspezifische Sonden (Fall 13)

(A) MCB #9 wurde hybridisiert, in der Mitte sind die Chromosomen in den Falschfarben dargestellt, die von den entsprechenden Fluorochromprofilen flankiert werden. Das derivative Chromosom ist in der rechten Bildhälfte zu sehen. (B) Die Lokalisation der eingesetzten FISH-Sonden ist dargestellt. (C) Das CGH-Profil vom Chromosom 9 ist abgebildet, der grüne Balken markiert die Region mit Chromatinzugewinn. (D - G) Hybridisierungsbilder von Mikrosezierungs- und YAC-Sonden sind zu sehen, das derivative Chromosom ist jeweils in der rechten Bildhälfte abgebildet. Die Region 9q21.1 liegt nicht dupliziert vor (D); YAC 806f02 ist ein repräsentativer Bruchpunkt-überspannender YAC-Klon mit 3 Hybridisierungssignalen (E); YAC 933g6 zeigt die Duplikation der Region 9q22.3 (F) während YAC 957h08 (9q31.2 - 31.3) nur ein Signal zeigt.

MCB im Vergleich zu Mikrosezierung, M-FISH und acro-cenM-FISH

Im Fall 21 wurde bei einem 2jährigen Patienten mit Entwicklungsverzögerung und weiteren klinischen Symptomen (siehe Tabelle 8.5, Trifonov *et al.*, 2003) nach Giemsa-Bänderung ein im kurzen Arm vergrößertes Chromosom 13 beschrieben (Abb. 3.9 B). Eine M-FISH Untersuchung mit wcp-Sonden (Abb. 3.9 A) sowie eine Hybridisierung mit dem acro-cenM-FISH SONDENSET (siehe Material und Methoden - Tabelle 2.3) erfolgte, beide Untersuchungen erbrachten methodisch bedingt keine Hinweise darauf, welches chromosomale Material in die vorliegende strukturelle Aberration involviert ist. Daraufhin wurde von Hr. Dr. V. Trifonov eine Mikrosezierung des fraglichen Bereiches vorgenommen, und die Hybridisierung der so etablierten DNA-Sonde auf normale Metaphaseplatten ergab, neben Signalen auf den kurzen Armen aller akrozentrischen Chromosomen, jeweils noch ein Signal in der terminalen Region des kurzen Arms von Chromosom 6. Die Hybridisierung einer pcg 6p-Sonde kombiniert mit einer Sub-Telomer-Sonde für 6p auf Metaphasen des Patienten zeigte, neben den regelrechten Signalen auf beiden Chromosomen 6, auch eine Anfärbung auf dem derivativen Chromosom 13 (Bild hier nicht gezeigt). Eine exakte Beschreibung der in die Aberration involvierten chromosomalen Bereiche war nach Hybridisierung mit MCB #6 übereinstimmend möglich (Abb. 3.9 C). Das im p-Arm vergrößerte Chromosom 13 resultiert aus einer partiellen Trisomie 6p22.2 - pter.

**Abb. 3.9****Strukturaufklärung eines der(13)t(6;13)(6pter→6p22.2::13p11.2→13qter) (Fall 21)**

(A) Ein Karyogramm nach M-FISH ist abgebildet. Im derivativen Chromosom 13 konnte keine spezifische Färbung mit den wcp-Sonden erzielt werden. Im unteren Teil des Bildes sind die jeweiligen Einzelfarben der Chromosomen 6 und 13 dargestellt. (B) Das nach GTG-Bänderung beschriebene derivative Chromosom 13 ist in der rechten Bildhälfte dargestellt. (C) Nach MCB #6-Hybridisierung war eine exakte Beschreibung des trisomen Bereiches möglich (6p22.2 - pter). Der nicht spezifisch angefärbte Bereich des derivativen Chromosoms 13 ist grau unterlegt.

MCB im Vergleich zu cenM54-FISH und lokusspezifischen Sonden

Fall 22 wurde unter Berücksichtigung der klinischen Aspekte publiziert in Nietzel *et al.*, 2003.

Nach konventioneller Bänderung von Chromosomen aus peripherem Blut wurde folgender Karyotyp beschrieben: 48,XX,+2mar. Um die Herkunft dieser im GTG-Bild identisch erscheinenden überzähligen Chromosomen abzuklären, wurde zuerst der cenM54-FISH-Mix (siehe auch Tabelle 2.3) hybridisiert (Abb. 3.10 A). Dabei konnte festgestellt werden, daß die beiden Marker Zentromer-Anteile von Chromosom 15 enthalten und als dizentrische Chromosomen mit jeweils zwei p-Armen beschrieben werden können. Mit zwei spezifischen Zentromer-Sonden für Chromosom 15 (α -Satellit- und Satellit-III-Sonde) wurde der cenM-FISH Befund bestätigt (Bilder hier nicht gezeigt). Die Hybridisierung von MCB #15 (Abb. 3.10 B) ergab, daß im Karyotyp der Patientin eine partielle Hexasomie für 15pter - 15q13 vorliegt. Eine Hybridisierung mit lokusspezifischen Sonden (*SNRPN* und *D15S10* lokalisiert in der Region 15q13) zeigte pro Metaphaseplatte 6 Signale (je ein Signal auf den beiden normalen Chromosomen 15 und je zwei Signale auf den derivativen Chromosomen) und bestätigten den durch MCB #15 erhobenen Befund (Bilder der Hybridisierung mit den lokusspezifischen Sonden hier nicht gezeigt). Der Karyotyp kann folgendermaßen beschrieben werden:

48,XX,+idic(15)(pter→q13::q13→pter)x2.ish 15q13(*SNRPN*x6,*D15S10*x6).

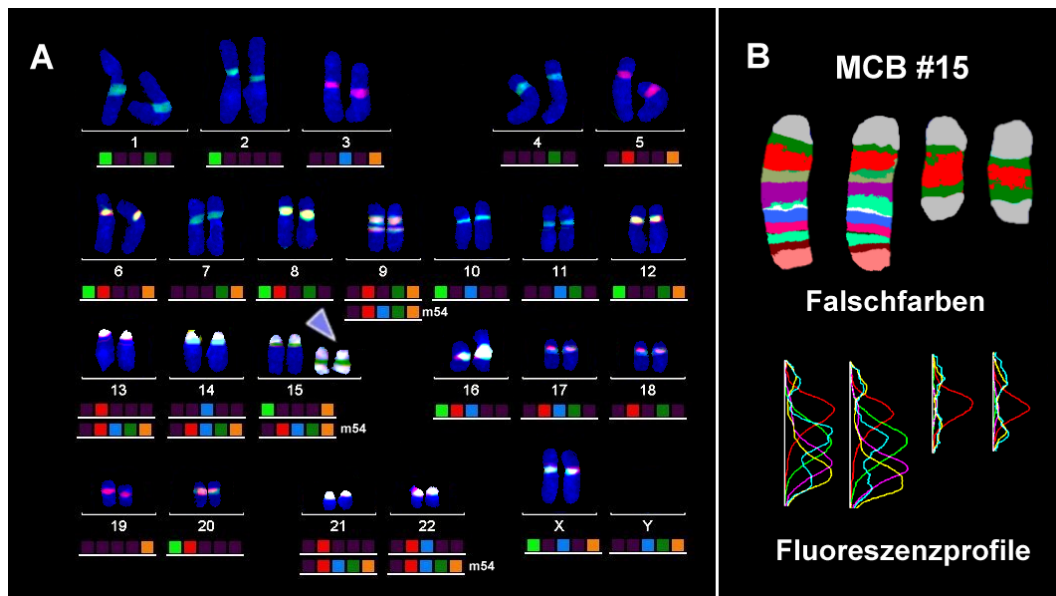


Abb. 3.10

Charakterisierung von 2 Markerchromosomen als 2x idic(15)(pter→q13::q13→pter) durch cenM54-FISH und MCB #15 (Fall 22)

(A) Der cenM-FISH-Mix wurde zusammen mit der midi 54-Sonde hybridisiert (=cenM54-FISH); hier ist ein Karyogramm zu sehen. Eine Überlagerung der aufgenommenen Einzel-Farb-Bilder ist dargestellt, dadurch sind einige Zentromere ähnlich gefärbt. Unter den jeweiligen Chromosomen sind die eingesetzten Fluorochrome abgebildet. (B) Es sind sowohl die Falschfarben als auch die Profilkurven der beiden normalen Chromosomen 15 und der Derivatchromosomen nach MCB dargestellt. Die p-Arme der Chromosomen 15 sind jeweils grau unterlegt.

MCB im Vergleich zu cenM-FISH, Micro-CGH und lokusspezifischen Sonden

Liegen aberrante Chromosomen bzw. -bruchstücke vor, auch als *Small-supernumerary-marker-chromosomes* (SMCs) bezeichnet, dann besteht das Ziel darin, die Zusammensetzung dieser Chromosomenderivate zu identifizieren. Durch GTG-Analysen ist eine konkrete Aussage zur Herkunft des derivativen Chromosoms nur in sehr wenigen Fällen möglich. Es ist zu klären, ob und welches Zentromer im fraglichen Chromosomderivat enthalten ist; die entscheidendere Frage aber kommt dem Vorhandensein von verbliebenem euchromatischem Material zu. Im Fall 25 (siehe Tabelle 8.5) wurde bei einem Patienten mit einer CML ein Karyotyp mit einem SMC nachgewiesen (siehe auch Starke *et al.*, 2001). Eine Mikrosezierung des Markers mit anschließendem *Reverse-painting* der Sonde auf Zellen des Patienten ergab eine komplette Anfärbung des Markers sowie starke Signale im Zentromer der beiden normalen Chromosomen 11 (Abb. 3.11 A). An dekondensierteren Chromosomen war zusätzlich eine schwache Anfärbung in der Region 11q14 sichtbar. Die MCB #11-Sonde wurde eingesetzt, und auf dem Ringchromosom konnten Fluoreszenzsignale der Zentromer-Region und aus der Region 11q14 zugeordnet werden (Abb. 3.11 B). Die *Micro-CGH*-Technik (Heller *et al.*, 2000) wurde durchgeführt, um eine mögliche Genamplifikation in 11q14 sichtbar zu machen (Abbildung hier nicht gezeigt). Nach Auswertung der Intensitätsprofile war lediglich eine schwache Verschiebung für einen Zugewinn in der Zentromer-Region von Chromosom 11 zu detektieren. Eine Interphase-FISH Untersuchung mit einer Zentromer-Sonde für Chromosom 11 zeigte, daß das überzählige Ringchromosom in 83 % der Knochenmarkszellen vorliegt. Das Derivatchromosom - ein Ringchromosom - kann zusammenfassend wie folgt beschrieben werden: r(11)(::p11.2→q13.1::q14::).

Durch MCB konnte das Ergebnis nach Mikrosezierung und *Reverse-painting* des derivativen Chromosoms bestätigt werden bzw. erfolgte eine Präzisierung der Bruchpunktlokalisation.

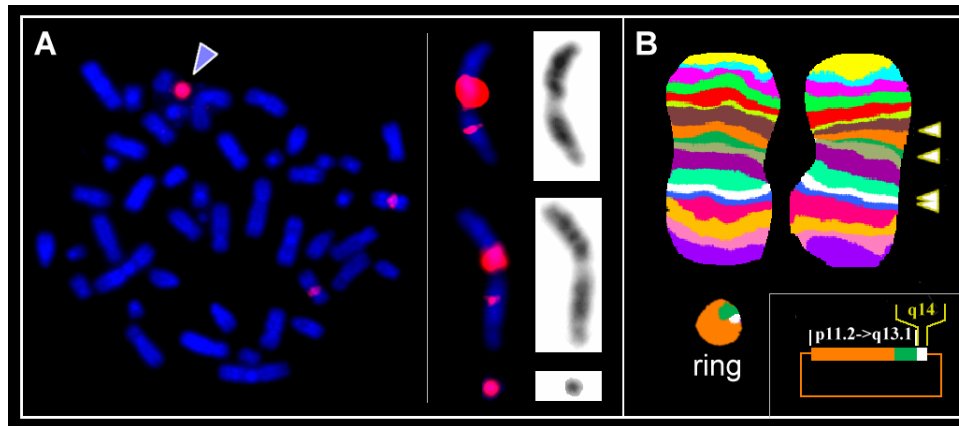


Abb. 3.11

Strukturaufklärung eines Ringchromosoms durch Mikrosezierung und MCB (Fall 25)

(A) Eine Metaphaseplatte des Patienten nach *Reverse-painting* der Mikrosezierungssonde ist dargestellt. Die Pfeilspitze markiert das Markerchromosom, welches komplett angefärbt ist. Im rechten Teil des Bildes sind dekondensierte Chromosomen 11 und der Marker dargestellt; man kann hier ein zusätzliches Signal in der chromosomalen Region 11q14 erkennen. (B) Die beiden normalen Chromosomen 11 des Patienten sowie der Ring sind nach MCB #11 zu sehen. Die Pfeilspitzen markieren jeweils die Bruchpunkte, die zur Entstehung des Ringchromosom geführt haben. Im unteren rechten Teil des Bildes ist grafisch die Zusammensetzung des Ringchromosoms dargestellt.

Auch bei komplex rearrangierten Karyotypen wurden die erzielten MCB-Ergebnisse mit weiteren molekularzytogenetischen Methoden bzw. Sonden abgeglichen.

MCB im Vergleich zu M-FISH, SKY und Mikrosezierung

Im Fall 26 (Tabelle 8.5) waren in den zytogenetisch analysierten Knochenmarkszellen eines AML-Patienten sehr komplexe Chromosomenaberrationen sichtbar (Heller *et al.*, 2003), die nach GTG-Bänderung alleine nicht beschrieben werden konnten. Es wurde daraufhin eine M-FISH Analyse durchgeführt, ein Abgleich dieser Ergebnisse erfolgte durch eine SKY-Analyse (diese Untersuchung wurde von S. Kytölä, Finnland, vorgenommen). Beide Methoden des 24-Farben-FISH unter Verwendung von wcp-Sonden zeigten größtenteils übereinstimmende Resultate. Eine kleine Insertion von Material des Chromosoms 5 wurde in den Echtfarbdarstellungen beider Methoden sichtbar, in den resultierenden Falschfarben konnte diese Insertion mit dem SKY-System nicht mehr dargestellt werden. Der Karyotyp wurde nach M-FISH folgendermaßen beschrieben:

40~44,XY,-1,+der(1)t(1;8;20),-2,+del(2),-3,+der(3)t(3;6),-5,+der(5)t(5;18),-6,+del(6),-8,-9,-10,+der(10)t(3;10),-14,-15,-16,-17,+del(17),-18,+der(18)t(8;18;5;2;20),-20,+der(20)t(15;17;20),+der(20)t(1;20;18)[cp6]/46,XY[2].

Nachdem die in die komplexen Aberrationen involvierten Chromosomen identifiziert waren, wurden die jeweiligen MCB-Sondenmixe (für #1, #2, #5, #8, #18, #20) hybridisiert. Erst dadurch war eine exakte Zuordnung der chromosomalen Regionen und somit auch die Beschreibung der involvierten Bruchpunkte möglich (Abb. 3.12 A). Die Derivatvchromosomen 1, 2, 5, 18 und 20 wurden nach MCB präzisiert beschrieben:

ish der(1)t(1;5;8;20)(1qter→1p12::5q14.3→5q15 or 5q15→5q14.3::8p11.2→8p23.??3:
:20p11.1→20p13),
del(2)(q12),

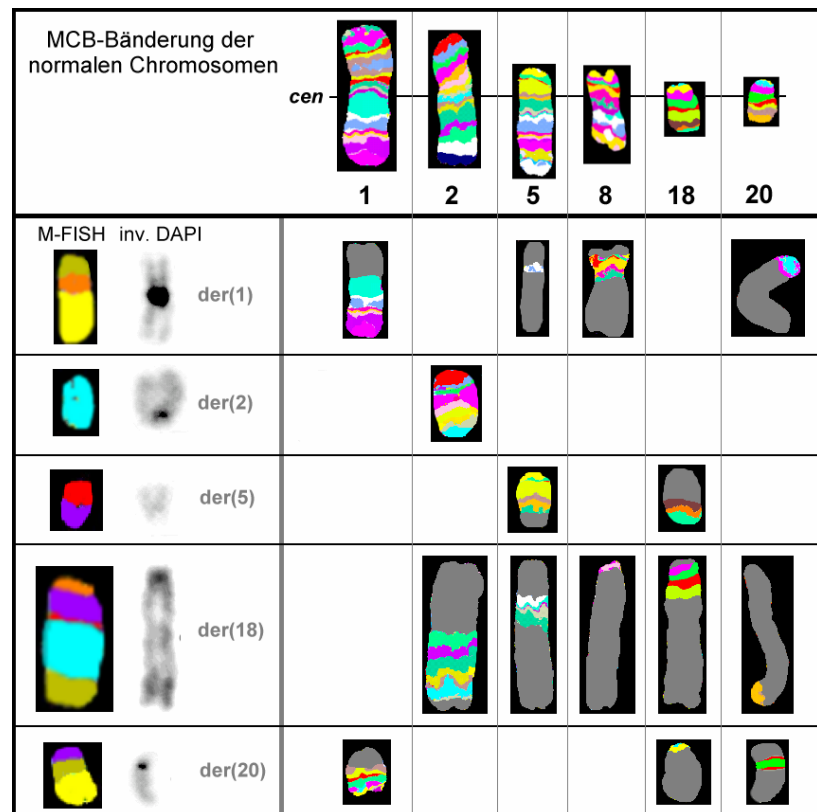
der(5)t(5;18)(5p15.33→5q11::18q21.3→18q23),

der(18)t(8;18;5;2;20)(8q24.3→8q24.2 or 8q24.2→8q24.3::18p11.22→18q21.3::5q14.3→
5q11::2q32→2q12::20q13.2→20q13.33),

der(20)t(1;20;18)(1p36.33→1p31.3-22.3::20p11.1→20q11.2 or 20q11.2→20p11.1:
:18p11.22→18p11.32).

Abb. 3.12 A
Identifizierte Bruchpunkte
derivativer Chromosomen
mit bis zu 5 Trans-
lokationspartnern (hoch-
komplexer Karyotyp) in
Fall 26

Im oberen Teil der Abbildung sind die normalen Chromosomen dargestellt, die derivativen Chromosomen sind anschließend zu sehen. In der linken Spalte sind dabei die M-FISH und die invertierten DAPI-Bilder gezeigt, es schließen sich die MCB-Ergebnisse an. Grau unterlegt sind jeweils die nicht markierten Bereiche in den Chromosomen.



Eine kleine Insertion von Chromosom 5 in der(1) konnte weder nach M-FISH noch nach SKY beschrieben werden, wurde aber nach Anwendung von MCB #5 sichtbar.

Eine Überprüfung der nach MCB beschriebenen Bruchpunkte erfolgte durch eine Mikrosezierung der aberranten Chromosomen 1 und 18 (Abb. 3.12 B); die Mikrosezierung wurde von Dr. N. Rubtsov durchgeführt. Eine Hybridisierung der so gewonnenen Banken auf Metaphaseplatten eines chromosomal unauffälligen Probanden ermöglichte es, die in die Derivatchromosomen involvierten chromosomalen Bereiche anhand des invertierten DAPI-Bildes zu identifizieren. Für das Chromosom der(1) wurden folgende involvierte Regionen beschrieben: 1q10-qter, 5q11.1-q12, 5q15, 8p23-q12, 20pter-p11.2, für der(18) folgende Bereiche: 2q12-q37.2, 5q11.2-q14, 8q24.2-qter, 18p11.2-q21 und 20q13.2-qter. Ein Vergleich mit den nach MCB beschriebenen Bruchpunkten zeigte eine gute Übereinstimmung der beiden Ergebnisse, eine Abweichung mit der Größe einer kleinen GTG-positiven Bande im 550 Bandenstadium war in einigen der beschriebenen Bereiche festzustellen. Nach Hybridisierung der Mikrosezierungsprobe des derivativen Chromosoms 18 auf normalen Metaphaseplatten wurde ein zusätzliches Signal in 5q11.2 - q12 nachgewiesen, welches nach MCB-Analyse des Markerchromosoms nicht beschrieben werden konnte. Dieses zusätzliche Signal ist auf die bekannte Kreuzhybridisierung alpherer Sequenzen der Zentromer-Region von Chromosom 1 mit den Zentromeren der Chromosomen 5 und 19 zurückzuführen.

Nach Mikrosezierung der beiden Markerchromosomen wurden gleiche Bereiche und annähernd gleiche Bruchpunkte wie nach MCB beschrieben, jedoch erlaubt die Mikrosezierung keine Aussage über die Reihenfolge der chromosomalen Bereiche sowie deren Orientierung im Derivatchromosom.

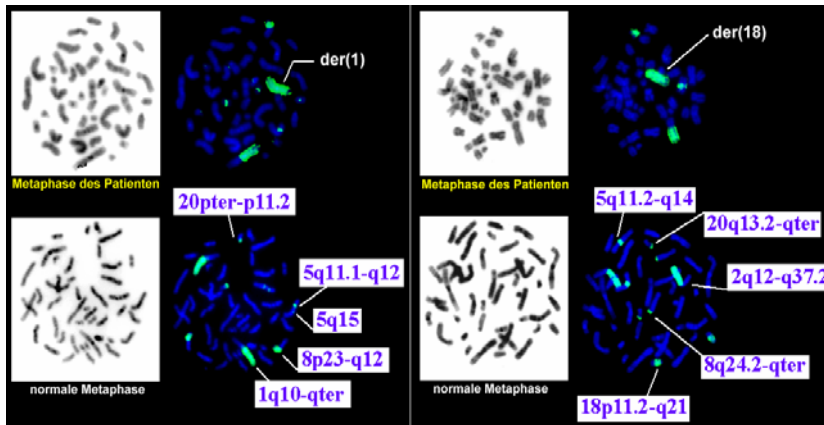


Abb. 3.12 B
Aufklärung der Zusammensetzung von der(1) und der(18) nach Mikrosequenzierung und „reverse painting“ (Fall 26)

Die Mikrosequenzierungsbanken wurden sowohl auf Metaphasen des Patienten (obere Bildhälfte) als auch auf Metaphasen mit normalem Karyotyp (untere Bildhälfte) hybridisiert.

MCB im Vergleich zu M-FISH und Micro-CGH

Im Fall 27 lag zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion ein primäres Plasmozytom mit Übergang in eine Plasmazellenleukämie vor (Heller *et al.*, *in press-c*). Nach der routinemäßigen GTG-Bänderung wurde ein hochkomplexer Karyotyp (siehe Tabelle 8.5, Abb. 3.13 A) mit mehreren numerisch und strukturell aberranten Chromosomen beschrieben. Eine M-FISH-Analyse konnte zur weiteren Identifikation der in die Aberrationen involvierten Chromosomen beitragen (Abb. 3.13 B). Folgende MCB-Sonden wurden hybridisiert: #1, #3, #5, #7, #8, #9, #11, #13, #14, #15, #17, #19, #X. Die Beschreibung der chromosomalen Bruchpunkte und die Orientierung der in die Aberrationen involvierten Regionen konnte daraufhin erfolgen (Abb. 3.13 D [m1 - m7]). Weiterhin wurden kryptische Veränderungen in den numerisch aberranten Chromosomen durch die MCB-Analyse ausgeschlossen (MCB-Ergebnisse der numerisch veränderten Chromosomen nicht abgebildet). Durch die MCB-Analyse konnten zudem zwei bis dato nicht durch Giemsa-Bänderung bzw. M-FISH detektierte Aberrationen beschrieben werden. Es wurde ein vorher nicht identifiziertes Isochromosom 19 [i(19)(q10)] nachgewiesen (entspricht in Abb. 3.13 D m7), weiterhin war ein derivatives Chromosom 9 zu beschreiben [der(9)t(8;11;9)(8qter→8q24.2::11q25→11q14::9p11.1→9qter)]. Letzteres wurde nur in einem sehr kleinen Teil der beurteilten Metaphaseplatten nachgewiesen (ca. 1/30) und konnte deshalb nicht in der M-FISH Analyse detektiert werden (dieses derivative Chromosom 9 ist nicht abgebildet).

Eine Überprüfung der MCB-Ergebnisse erfolgte durch eine *Micro-CGH* von Zellkernen des Patienten. Die resultierenden CGH-Profile sind in Abb. 3.13 C dargestellt und können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

rev ish enh(3,7,8,9,15,19p),dim(1p31.1p10,13,14q21q31),amp(1q12q44,5p15.3q14, 11q14q25,Xq21.3q28).

Die Ergebnisse der *Micro-CGH* sind in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen nach GTG, M-FISH und den MCB-Analysen. Nach *Micro-CGH* wurde zusätzlich ein Verlust der chromosomalen Region 14q21q31 beschrieben, der mit MCB nicht bestätigt werden konnte.

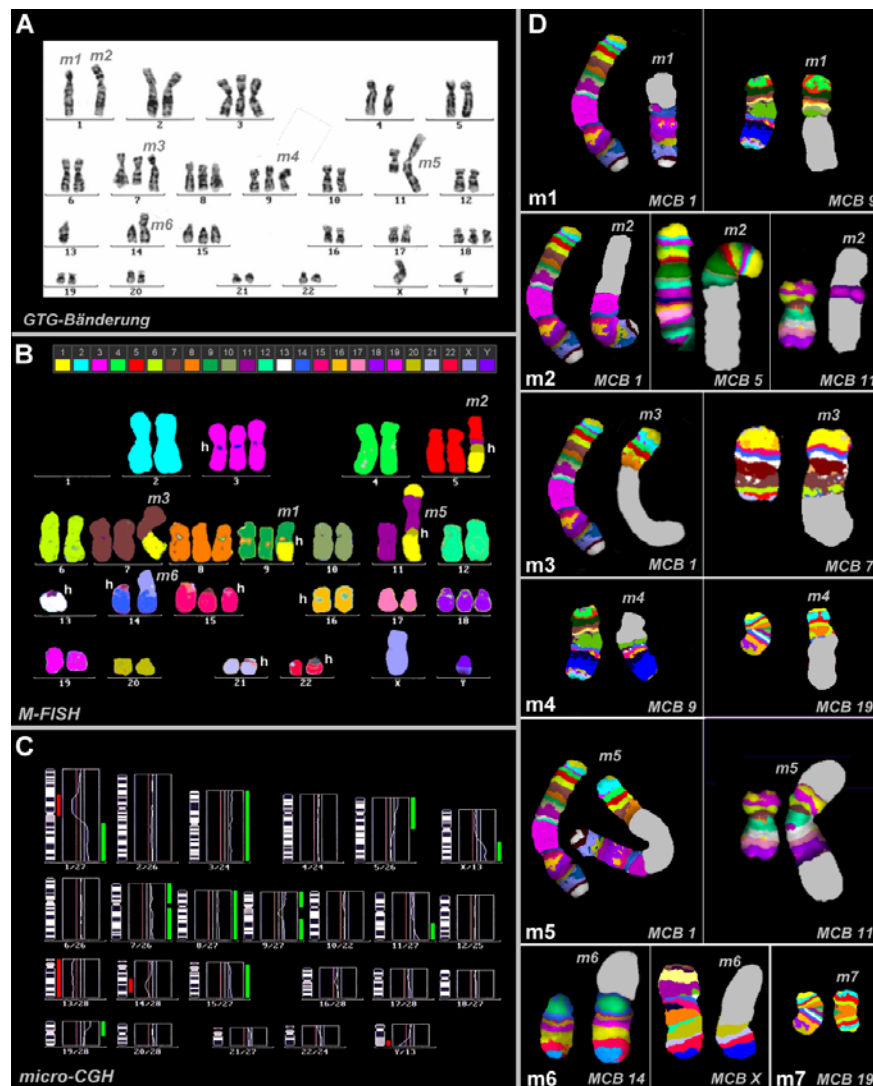


Abb. 3.13

Aufgeklärte Struktur und Bruchpunkte von aberranten Chromosomen eines komplexen Karyotyps (Fall 27) nach Einsatz verschiedener molekularzytogenetischer Techniken

(A) Die GTG-Bänderung ließ einen komplexen Karyotyp erkennen; 6 Derivatvchromosomen wurden detektiert (m1 - m6). (B) Durch eine M-FISH-Analyse war es möglich, die in die Aberrationen involvierten Chromosomen genauer zu beschreiben. Hier sind die resultierenden Falschfarben dargestellt, im oberen Teil des Bildes befindet sich eine Farblegende der jeweiligen Chromosomen. Heterochromatin, in den zentromerischen Bereichen der Chromosomen 1, 3, 8, 9, 16 und 18 sowie in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen vorhanden, wird methodisch bedingt durch die eingesetzten wcp-Sonden nicht angefärbt und hat hier entsprechend andere Falschfarben als die Chromosomen selber; eine Kennzeichnung durch „h“ erfolgte. (C) Die *Micro-CGH*-Profile zeigten sowohl vollständige als auch partielle Verluste oder Zugewinne von Chromosomen oder -regionen. In rot dargestellt: Verluste, grün: Zugewinne chromosomalen Materials. (D) Die MCB-Falschfarben der Derivatvchromosomen m1 - m7 sind dargestellt. Die normalen Chromosomen sind jeweils auf der linken Seite der Einzelbilder zu sehen.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Methode des MCB geeignet ist, chromosomale Aberrationen zu beschreiben und verlässliche Aussagen zu den Bruchpunkten zu treffen. Eine Evaluierung der MCB-Ergebnisse wurde durch den Einsatz anderer Methoden der *in-situ*-Hybridisierung, wie M-FISH mit wcp-Sonden, cen54M-FISH, acro-cenM-FISH, *Micro-CGH*, Mikrosezierung und durch Einsatz lokusspezifischer Sonden, vorgenommen. Die Auswahl der zur Evaluierung eingesetzten Methoden war abhän-

gig vom vorliegenden Aberrationstyp, der Verfügbarkeit der einzelnen Verfahren sowie der zu untersuchenden Zellen.

In allen Fällen waren die MCB-Ergebnisse im Einklang mit den durch andere molekularzytogenetische Methoden erhaltenen Ergebnisse. In einigen Aberrationen konnte durch MCB eine Präzisierung der Bruchpunktlokalisation erzielt werden (siehe zusammenfassende Tabelle 8.5). So war in den Fällen, in denen M-FISH, *Micro-CGH* oder eine Mikrosezierung der derivativen Chromosomen vorgenommen wurde, eine exaktere Beschreibung der Bruchpunkte und der Orientierung der chromosomalen Bereiche erst mit MCB möglich – siehe z. B. Fall 26 und 27. Durch den Einsatz lokusspezifischer Sonden wurde wiederum eine Präzisierung der MCB-Ergebnisse erzielt, so z. B. im Fall 13, in welchem nach Einsatz von YAC-Sonden die involvierten chromosomalen Sub-Banden und die Orientierung des duplizierten Fragments beschrieben werden konnte.

3.2.2 Nachweis chromosomaler Umbauten in ZOO-FISH-Studien

Sogenannte ZOO-FISH-Studien wurden ebenfalls zur Evaluierung der MCB-Methode herangezogen.

Es erfolgte eine Überprüfung, inwieweit die MCB-Technik Aussagen zu intrachromosomalen Rearrangements ermöglicht. Ferner dienten diese Untersuchungen dem Nachweis, daß die MCB-Sonden auch an Zelllinien einsetzbar sind.

Der Hybridisierung aller in den MCB-Sondenmixen zur Verfügung stehenden menschlichen Mikrosezierungsbanken auf *Gorilla gorilla* (GGO)- und *Hylobates lar* (HLA)-Chromosomen folgte ein direkter Vergleich der Falschfarb-Bandenabfolge zwischen *Homo sapiens* (HSA) und GGO bzw. HLA.

Da sowohl für die Gorilla- als auch für die Hylobates-Chromosomen keine international gebräuchliche Nomenklatur zur Verfügung steht und eine Charakterisierung ausschließlich mittels humaner MCB-Banken erfolgte, werden im folgenden die Bruchpunkte entsprechend den homologen humanen Chromosomen (ISCN, 1995) angegeben.

Die hier beschriebenen ZOO-FISH-Studien wurden von K. Mrasek im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt, die von der Promovierenden betreut wurde.

3.2.2.1 Darstellung der Homologie der *Gorilla gorilla* (GGO)-Chromosomen im Vergleich zu *Homo sapiens* (HSA)

Mittels 25M-FISH (siehe Material und Methoden, Tabelle 2.3) wurde zunächst eine Karyotypisierung der GGO-Chromosomen vorgenommen, und ein allgemeiner Überblick der Gorilla-Chromosomen und der Veränderungen im Vergleich zu humanen Chromosomen konnte erhalten werden (Mrasek *et al.*, 2001). Die Zuordnung der Gorilla-Chromosomen erfolgte mittels invertiertem DAPI-Bild (Abb. 3.14 A). Die Homologie chromosomaler Abschnitte zu HSA wurde anhand der Farbkombinationen der eingesetzten Sonden beurteilt. So konnte die bekannte „balancierte“ Translokation zwischen den GGO-Chromosomen 4 und 19 (entspricht den HSA #5 und #17) nachgewiesen werden. In ca. 30 % der untersuchten Metaphasen der lymphoblastoiden Zelllinie wurde weiterhin eine unbalancierte Translokation zwischen GGO #1 und #14 gefunden, die zu einer partiellen Monosomie GGO #1 und einer partiellen Trisomie GGO #14 führte (siehe Abb. 3.14 B). Durch Einsatz der MCB-Sondenmixe konnte die Aberration als partielle Trisomie 13q21.3→q34 und partielle Monosomie 1q43→q44 beschrieben werden. Diese Translokation muß als Kulturartefakt angesehen werden, die durch eine Immortalisierung der Zellen mit Epstein-Barr Viren entstanden sein kann (Stumm *et al.*, 2001).

Die spezifische Sonde für die kurzen Arme aller humanen akrozentrischen Chromosomen (midi 54) hybridisierte auf folgenden homologen GGO-Chromosomen:

- in den perizentrischen Regionen von GGO #6, #11, #16, #17 und #18
- auf den kurzen Armen von GGO #12, #13, #14, #15, #22 und #23 (Abb. 3.14 A).

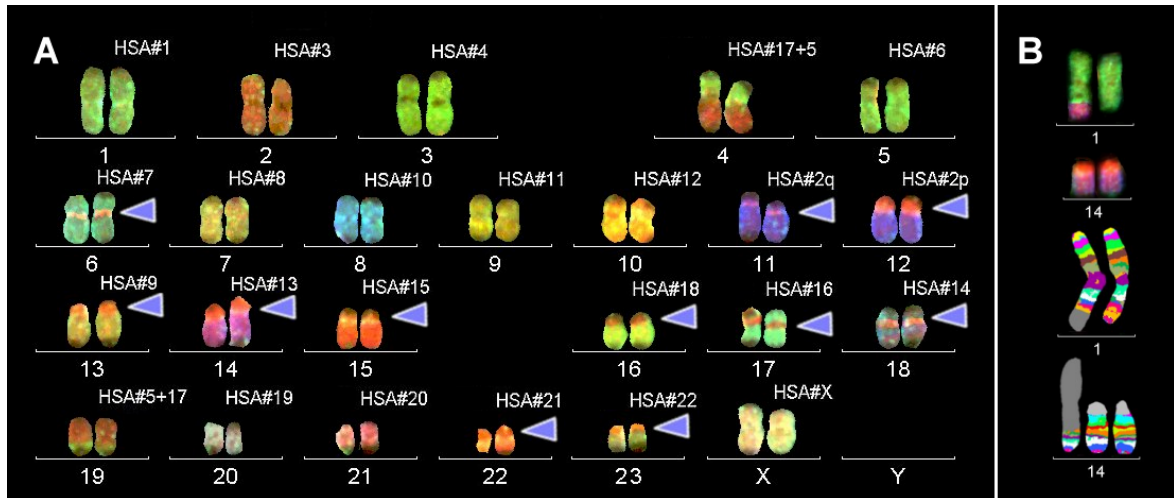


Abb. 3.14

Identifizierte homologe Bereiche zwischen HSA- und GGO-Chromosomen

(A) Ein GGO-Karyogramm nach 25M-FISH ist dargestellt. Über den Chromosomen sind jeweils die homologen humanen Chromosomen aufgezählt. Die Pfeilspitzen zeigen die Hybridisierungsregionen der midi 54-Sonde. (B) Die unbalancierte Translokation zwischen GGO #1 und GGO #14 ist abgebildet. Im oberen Abschnitt sind die Echtfarben (nach 25M-FISH Hybridisierung) gezeigt, im unteren Bildabschnitt die entsprechenden MCB-Falschfarben der humanen MCB-Banken #1 und #13. Die grau markierten Bereiche sind jeweils die Regionen, die mit den entsprechenden Sonden nicht dargestellt werden können.

Die Resultate aller MCB-Einzelhybridisierungen an GGO-Chromosomen im Vergleich zu HSA sind in Abb. 3.15 und Tabelle 3.1 dargestellt.

Folgende Ergebnisse resultieren nach Hybridisierung aller humanen MCB-Sonden auf GGO-Chromosomen (Mrasek *et al.*, 2001):

- Der GGO-Karyotyp ist dem menschlichen Karyotyp relativ ähnlich.
- Bei den GGO-Chromosomen 2, 5, 9, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23 und X wurden keine Unterschiede der Bandenabfolge zum humanen MCB-Falschfarbmuster identifiziert.
- Bei den GGO-Chromosomen 4 und 19 konnten nach MCB Fusionen beschrieben werden.
- Die GGO-Chromosomen 11 und 12 sind weitgehend homolog dem HSA-Chromosom 2.
- Parazentrische Inversionen waren in den GGO-Chromosomen 1q, 6q sowie 17p und perizentrische Inversionen in #3, 7, 8, 10, 12, 13 und 18 mit MCB nachweisbar.
- Nur im GGO #11 konnte ein Neo-Zentromer detektiert werden, welches sich in 2q21.1 befindet.
- Es wurden im Vergleich zu den HSA-Chromosomen 20 Bruchpunkte nachgewiesen.

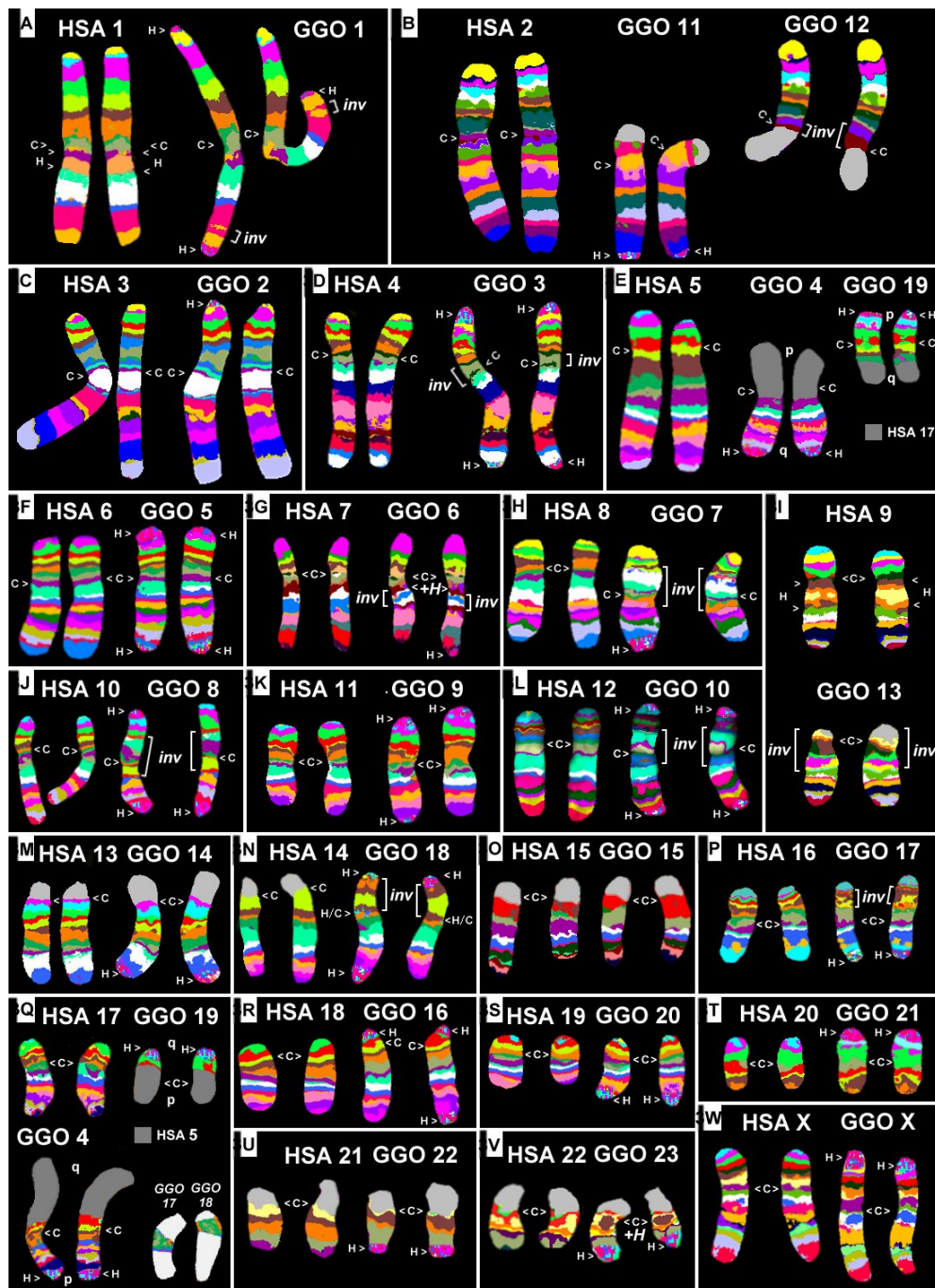


Abb. 3.15

Homologie der Chromosomenstruktur zwischen HSA und GGO nach MCB

Die einzelnen humanen MCB-Falschfarben sind den Falschfarben auf den entsprechenden homologen GGO-Chromosomen gegenübergestellt. Die grau dargestellten Bereiche sind jeweils die Regionen, die mit den entsprechenden Sonden nicht markiert werden konnten.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

H: Heterochromatin

C: Zentromer

Inv: Inversion.

Tabelle 3.1**Chromosomale Umbauten und Bruchpunkte im GGO-Genom verglichen mit HSA nach MCB-Analysen**

Inversionen wurden jeweils blau hervorgehoben.

Rot unterlegt ist die Zentromer-Position, an der sich – im Vergleich zu den humanen Chromosomen – ein Neo-Zentromer formiert hat.

GGO Chr.	Homologe Regionen zu HSA	Zentromer-Position
1	1p36.3→1q32.3:: 1q42.13→1q32.3 ::1q42.13→1q44	cen 1
2	3p26.3→3q29	cen 3
3	4p16.3→4p12:: 4q13.2→4p12 ::4q13.2→4q35.2	cen 4
4	17q25→17p12::5q13.3→5q35.3	cen 17
5	6p25.3→6q27	cen 6
6	7p22.3→7q11.23:: 7q22.3→7q11.23 ::7q22.3→7q36.3	cen 7
7	8p23.3→8p21.1:: 8q22.3→8p21.1 ::8q22.3→8q24.3	cen 8
8	10p15.3→10p11.23:: 10q22.3→10p11.23 ::10q22.3→10q26.3	cen 10
9	11p15.5→11q25	cen 11
10	12p13.33→12p11.23:: 12q14.2→12p11.23 ::12q14.2→12q24.33	cen 12
11	2q13→2q37	neo 2q21.1
12	acro:: 2p10→2q13 ::2p10→2p25.3	cen 2
13	acro:: 9q13→9p24.3 ::9q13→9q34.3	cen 9
14	13p13→13q34	cen 13
15	15p13→15q26.3	cen 15
16	18p11.32→18q23	cen 18
17	16p11.2→16p13.3 ::16p11.2→16q24.3	cen 16
18	14q11.2→14p11.3 ::14q11.2→14q32.33	cen 14
19	5q14→5p15.3::17p12→17p13.3	cen 5
20	19p13.3→19q13.43	cen 19
21	20p13→20q13.33	cen 20
22	21p11.3→21q22.3	cen 21
23	22p11.3→22q13.33	cen 22
X	Xp22.33→Xq28	cen X
Y	nicht untersucht	nicht untersucht

Abkürzungen: cen = Zentromer
neo = Neo-Zentromer

Eine Überprüfung einzelner MCB-Ergebnisse erfolgte durch Hybridisierung weiterer Sonden:

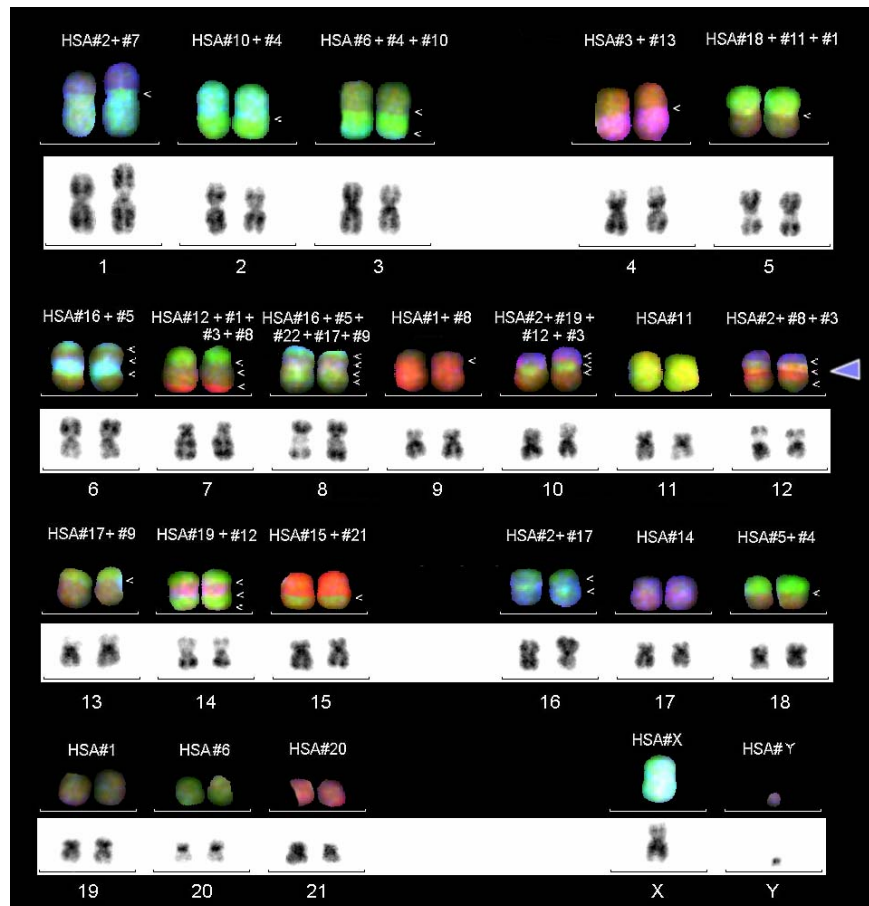
- Eine pcp 18q-Sonde wurde zusammen mit der midi 58 hybridisiert. Diese midi 58 ist eine spezifische HSA-Mikrosezierungsonde, die das komplette Chromosom 18 mit Ausnahme der Region 18q11.2 - q12.2 abdeckt. Nach vergleichender Hybridisierung ergab sich für GGO #16 das entsprechende Signalmuster wie für HSA #18.
- Auf GGO #14 wurden noch 2 zusätzliche YAC-Contigs von HSA #13 hybridisiert (*Contig A1* hybridisiert in 13q12, *D1.1* hybridisiert in 13q13).

3.2.2.2 Darstellung der Homologie der *Hylobates lar* (HLA)-Chromosomen im Vergleich zu *Homo sapiens* (HSA)

Auch hier wurde vor Beginn der MCB-Studien eine 25M-FISH-Analyse zur Karyotypisierung der HLA-Chromosomen durchgeführt (Abb. 3.16, Tabelle 3.2). Nur in der GTG-negativen Region auf HLA #12p wurde ein Signal mit der midi 54-Sonde detektiert.

Abb. 3.16
Identifizierte homologe Bereiche zwischen HLA- und HSA-Chromosomen

Unter den gefärbten Chromosomen ist jeweils die invertierte DAPI-Bänderung dargestellt. Über den HLA-Chromosomen sind die homologen humanen Chromosomen entsprechend ihrer Reihenfolge aufgezählt. Die Pfeile zeigen die unterschiedlichen Homologiebereiche an. Durch die blaue Pfeilspitze bei HLA #12 wird die mit der midi 54 angefärbte Region dargestellt.



Da die Sonde für die kurzen Arme der humanen akrozentrischen Chromosomen (midi 54) kein Hybridisierungssignal in den entsprechenden Regionen der HLA-Chromosomen erbrachte, wurde auf den Einsatz der midi 54 in den entsprechenden humanen MCB-Mixen (#13, #14, #15, #21, #22) verzichtet.

Folgende Ergebnisse resultieren nach Hybridisierung aller humanen MCB-Sonden auf HLA-Chromosomen (siehe auch Abb. 3.17, Tabelle 3.2) (Mrasek *et al.*, 2003):

- Die humanen Chromosomen 20, X und Y sind ohne interchromosomale Rearrangements homolog zu den HLA-Chromosomen 21, X und Y.
- Das HSA-Chromosom 18 ist im HLA-Chromosom 5 ohne strukturelle Aberration integriert.
- Die HSA-Chromosomen 7, 13, 14, 15, 18, 20, 22, X und Y besitzen homologe Bereiche auf jeweils nur einem HLA-Chromosom und das sind #1, 4q, 17, 15, 5p, 21, 8, X und Y.
- Die humanen Chromosomen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 19 verfügen über homologe Regionen auf mehr als einem Gibbonchromosom.
- Bei fast allen HLA-Chromosomen (mit Ausnahme von 21, X und Y) konnten nach MCB Inversionen beschrieben werden.
- Nach Analyse von MCB #11 wurden auch Signale auf HLA #5 detektiert.

- Im HLA #17 wurde eine bisher nicht beschriebene parazentrische Inversion nachgewiesen.
- Es konnte außerdem festgestellt werden, daß HLA #12 homologe Regionen von HSA #2 und #3 sowie #8 enthält.
- Es wurden 3 verschiedene Möglichkeiten der Zentromer-Bildung nachgewiesen. So können die Zentromere denen der humanen Chromosomen homolog sein, sie können an Fusionsstellen zweier Chromosomen und in Form eines Neo-Zentromers ausgebildet sein (siehe Tabelle 3.2).
- Im Vergleich zu den HSA-Chromosomen konnten im HLA-Karyotyp 72 Bruchpunkte nachgewiesen werden.

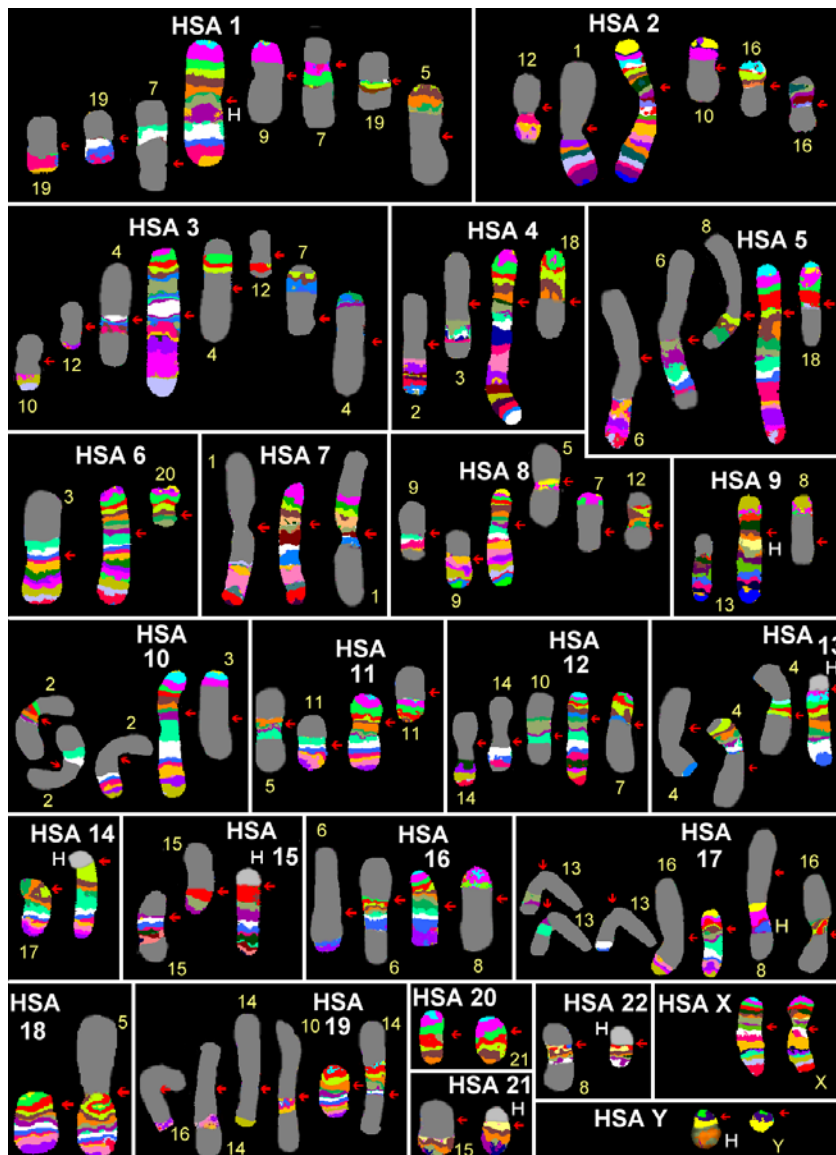


Abbildung 3.17
Homologie der Chromosomenstruktur zwischen HSA und HLA nach MCB

Die einzelnen humanen MCB-Falschfarben (weiß beschriftet) sind den Falschfarben auf den entsprechenden HLA-Chromosomen (durch gelbe Zahlen beschriftet) gegenübergestellt.

Die grau dargestellten Bereiche sind jeweils die Regionen, die mit den eingesetzten Sonden nicht markiert wurden. Der rote Pfeil markiert jeweils die Zentromerposition.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

H (in weiß): humanes Heterochromatin
 H (in gelb): Gibbon-Heterochromatin.

Tabelle 3.2**Chromosomale Umbauten und Bruchpunkte im HLA-Genom verglichen mit HSA nach MCB-Analysen**

Die chromosomalen Bereiche, die nach M-FISH nicht (eindeutig) identifiziert werden konnten, sind kursiv gedruckt. Rot unterlegt sind die Zentromer-Positionen, an denen sich – im Vergleich zu den humanen Chromosomen – ein Neo-Zentromer formiert hat, grün unterlegt kennzeichnet jeweils eine Zentromer-Bildung an Fusionsstellen.

HLA Chr.	Homologe Regionen zu HSA		Zentromer-Position
	nach M-FISH	nach MCB	
1	2, 7	2q37.3→2q24::7q31.1→7p22::7q31.1→7q36	cen 7
2	4, 10	4q35→4q26::10p12.2→10q21::10q23.1→10q21::10q23.1→10q26	cen 10
3	6, 4, 10	6q27→6q12::4q26→4q10::10p12.2→10p15	kein cen 6 sondern neo 6q15-16.1
4	3, 13	3p14.3→3p12::3p26→3p24::3q21→3p12::13p10→13q14.2::13q33→13q14.2::13q33→13q34	3p11::13p10; fus cen 3 und cen 13
5	18, 11, 1	18q23→18p11.3:: 8p23.3→8p23.1 ::11p11.2→11q12::1p11→1p31.1	kein cen 18 sondern cen 11
6	16, 5, 16, 5	16q24→16q23.1::5q23.3→5q14.1::16p13.1→16q23.1::5q23.3→5q35.3	kein cen 16 sondern fus 5q14.1 und 16p13.1
7	12, 1, 3, 8	12p13.3→12q11::1p35→1p31.3::1q21→1q24::3p14.3→3p22::8p22→8p23.1	cen 12
8	16, 5, 22, 17, 9	16p13.3→16p13.1::5q14.1→5p10::22q10→22q13.3::17p13→17p12::9p21→9p24	5p10::22q10 fus cen 5 und cen 22
9	1, 8	1p36.3→1p35::8q21.1→8p11.1::8q21.1→8q24.3	fus 8p11.1::8q21.1
10	2, 19, 12, 3	2p25→2p23.1::19q13.32→19q13.2::12p13.3→12q14::3q25→3q29	kein cen 12 sondern neo 12q13.2
11	11	11p11.2→11p15.5::11q12→11q25	neo 11q14
12	2, 8, 3	2q24→2q14::8p11.1→8p22::3p22or24→3p24or22::3q25→3p24	fus 2q14::8p11.1
13	17, 9	17q24.1→17q22::17q21.1→17q11.2::17q22→17q21.1::9p21→9q34.3	fus 17q21.1::9p21
14	19, 12, 19, 12	19q13.41or13.32→19q13.32or19q13.41::12q22→12q14::19q13.2→19p13.3::19q13.42→19q13.41::12q22→12q24.3	kein cen 19 fus 12q14::19q13.31
15	15, 21	15q21→15q11::15q21→15q26.3:: 21q11→21q22.3	cen 15 fus 15q11::15q21
16	17, 2	17q25.3→17q24.1::2p12→2q1(?)4::17q11→17p12::2p12→2p23.1:: 19q13.42→19q13.43	cen 17
17	14	14q21.3→14p10::14q21.3→14q32.3	cen 14
18	4, 5	4p16→4q10::5q10→5p15.3	4q10::5q10 fus cen 4 und cen 5
19	1	1q32.1→1q24::1p31.2→1p31.1::1q32.1→1q44	fus 1q24::1p31.2
20	6	6q12→6p25	cen 6
21	20	20p13→20q13.3	cen 20
X	X	Xp22.3→Xq28	cen X
Y	Y	Yp11.3→Yq11.2	cen Y

Abkürzungen: cen = Zentromer
neo = Neo-Zentromer
fus = Fusion

Durch Hybridisierung bestimmter regionspezifischer pcp-Sonden wurden einzelne Ergebnisse nach MCB überprüft.

- Mit einer HSA-Sonde für Chromosom 8 (#8p22 - p23) konnte die Homologie auf Regionen der Gibbonchromosomen 12 und 5 bestätigt werden.
- Eine rpcp-Sonde für 11p11.2 - q13.1 wurde auf HLA-Chromosomen hybridisiert und zeigte ein Signal auf HLA #5.
- Mit einer wcp 19-Sonde konnte das Ergebnis nach MCB erhärtet werden, daß HSA #19 homologe Bereiche zu HLA #16qter besitzt.

(Die Ergebnisse dieser Hybridisierungen wurden hier nicht dargestellt.)

Wie anhand dieser Untersuchungen gezeigt werden konnte, eignet sich die Methode des MCB, um komplex aberrante Zelllinien zu charakterisieren. In vergleichenden Studien zwischen unterschiedlichen Spezies (ZOO-FISH) kann die MCB-Technik eingesetzt werden, um homologe Bereiche zu identifizieren.

Eine Analyse von *Gorilla gorilla* und *Hylobates lar* wurde vorgenommen, im Vergleich zum Menschen lagen im HLA-Genom multiple Rearrangements vor.

Zwischen den bisher veröffentlichten Daten und den Ergebnissen nach MCB konnten größtenteils Übereinstimmungen beschrieben werden.

3.3 Charakterisierung chromosomaler Veränderungen durch MCB-Analysen

Nach Verifizierung der Genauigkeit der MCB-Methode im Vergleich zu anderen molekularzytogenetischen Techniken wurden verschiedene Aberrationen von weiteren Fällen mit konstitutionellen und tumorspezifischen Aberrationen mittels MCB untersucht. Derivative Chromosomen sollten dadurch charakterisiert werden, um Aussagen zu den chromosomalen Bruchregionen treffen zu können.

Im folgenden werden die Fälle betrachtet, in welchen bereits nach Giemsa-Bänderung Aussagen zum Aberrationstyp und den involvierten chromosomalen Regionen möglich waren und MCB-Analysen den Karyotyp bestätigten (siehe 3.3.1). Aber nicht alle chromosomalen Veränderungen konnten nach GTG-Bänderung identifiziert und bezüglich der Bruchpunkte exakt charakterisiert werden, eine Beschreibung der Aberrationen wurde in vielen Fällen jedoch durch MCB möglich (siehe 3.3.2).

3.3.1 MCB bestätigt Bruchpunkte der GTG-Bänderung

Die hier untersuchten Fälle sind in der Tabelle 8.6 aufgelistet.

Es wurden 7 Fälle mit konstitutionellen und 14 Fälle mit tumorspezifischen Aberrationen untersucht.

In 8 Fällen (28, 29, 35, 40, 43 - 45, 48) wurden nach GTG-Bänderung Translokationen beschrieben, 8 Fälle (30-33, 35, 37 - 38, 46) wiesen jeweils eine Inversion in einem Chromosom auf, 3 Fälle (39, 42, 47) hatten eine Deletion und ein weiterer Fall mit einem Isochromosom vom kurzen Arm des Chromosoms 12 (Fall 34) wurde charakterisiert. Im Fall 41 wurde eine Monosomie für Chromosom 7 beschrieben, die MCB-Analyse bestätigte diesen Befund und eine kryptische Aberration im verbliebenen Chromosom 7 konnte ausgeschlossen werden.

Exemplarisch werden hier die Fälle 32 und 33 (Abb. 3.18) sowie 34 vorgestellt.

Bei einer 26jährigen Patientin mit geistiger Behinderung wurde eine Inversion in Chromosom 18 beschrieben [inv(18)(q11.2q23)]. In einer daraufhin durchgeführten Elternunter-

suchung konnte der Vater als Träger der Inversion identifiziert werden. Die MCB-Analyse konnte in beiden Fällen die Bruchpunkte in 18q11.2 und 18q23 bestätigen.

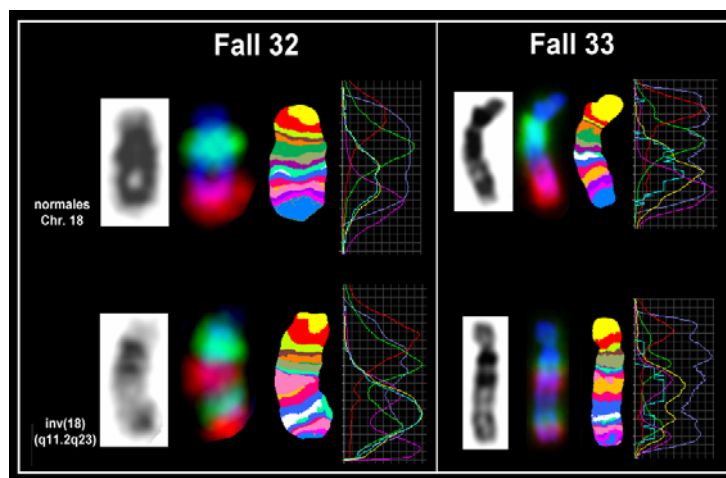


Abb. 3.18
Charakterisierung einer familiär vorliegenden inv(18)(q11.2q23) mittels MCB (Fall 32 und 33)

Die beiden normalen Chromosomen 18 sind in der oberen Bildhälfte abgebildet, die beiden Chromosomen mit Inversion in der unteren Bildhälfte. Es wurden das invertierte DAPI-Bild, die Chromosomen in Echtfarben und in Falschfarben und die Fluoreszenzprofile dargestellt.

Der Nachweis des Vaters als Träger der konstitutionellen Translokation kann als Hinweis gewertet werden, daß die klinische Symptomatik der Patientin in Fall 33 nicht in ursächlichem Zusammenhang mit dem nachgewiesenen Karyotyp zu sehen ist, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß durch fehlerhafte Rekombination ein – molekularzytogenetisch nicht nachweisbarer – unbalancierter Karyotyp bei der Tochter resultiert.

Eine direkte Korrelation des Genotyps zum Phänotyp besteht hingegen in Fall 34. Ein auffälliger Ultraschallbefund war die Indikation für eine Chorionzottenbiopsie. In den untersuchten Zellen wurde dann ein fragliches Isochromosom 12 p beschrieben, welches durch MCB #12 bestätigt werden konnte (Abbildung nicht gezeigt). Isochromosomen 12p, die zu einer Tetrasomie des kurzen Arms von Chromosom 12 führen, werden als genetische Ursache des Pallister-Killian-Syndroms beschrieben, welches mit einem schweren klinischen Erscheinungsbild einhergeht.

3.3.2 Bruchpunktkorrektur nach Anwendung von MCB

Im Abschnitt 3.3.2.1 werden konstitutionelle Aberrationen betrachtet, die Ergebnisse der Untersuchungen tumorspezifischer Aberrationen sind im Abschnitt 3.3.2.2 dargestellt. Die analysierten Fälle sind in Tabelle 8.7 aufgelistet.

3.3.2.1 Konstitutionelle Aberrationen

Die nach MCB erzielten Ergebnisse der Untersuchungen werden im folgenden entsprechend den vorliegenden Aberrationstypen dargestellt.

In 4 der **einfach aberranten Fälle** (49 - 52) wurden nach GTG-Bänderung **Translokationen** beschrieben. Die nach MCB vorgenommenen Korrekturen der Bruchpunktlokalisationen umfaßten dabei maximal eine Verschiebung um 3 Banden (bezogen auf ein Bandenlevel von 550 Banden pro haploiden Karyotyp; ISCN, 1995).

10 Fälle wurden mit verschiedenen MCB-Sonden (nach)untersucht, bei denen in den Derivatvchromosomen nach GTG jeweils eine **Inversion** beschrieben war (Fälle 53 - 63). Zum Einsatz kamen die MCB-Mixe der Chromosomen 1, 3, 8, 11 und Y. Im Fall 53 wurde eine Inversion im Chromosom 1 in Amnionzellen nachgewiesen, in einer daraufhin angeschlossenen Elternuntersuchung konnte die Mutter (Fall 54) als Trägerin der gleichen Inversion identifiziert werden. Familiarität lag auch in den Fällen 56 und 57 vor, sowohl bei der Mutter als auch bei der Tochter fand sich eine Inversion im Chromosom 8; die Tochter

(Fall 56) hatte eine zusätzliche Duplikation im kurzen Arm des Chromosoms 1, die *de-novo* vorlag. Bei zwei Brüdern (Fälle 60 und 61) und ihrem Vater (Fall 62) konnte jeweils die identische Inversion im Y-Chromosom nachgewiesen werden.

In 3 der 10 Fälle mit einer Inversion wurde nach dem MCB eine Korrektur der in die Aberration involvierten Bruchpunkte um max. 3 Banden (bezogen auf 550 Banden pro haploiden Karyotyp) vorgenommen, in 7 Fällen war erst nach Hybridisierung der MCB-Sonden eine Beschreibung des Karyotypes möglich.

5 Fälle zeigten eine parazentrische Inversion, in den anderen 5 Fällen lag eine perizentrische Inversion vor.

Duplikationen wurden in 5 Fällen (63 - 67) mittels MCB untersucht bzw. als Ursache der Derivatvchromosomen beschrieben. In 2 Fällen lag eine Duplikation im Chromosom 1 vor (Fall 63, 64), weitere Fälle wurden mit MCB #10, #12 und #18 (Fälle 65 - 67) analysiert. In 2 der untersuchten Fälle konnte erst nach MCB die Aberration als Duplikation beschrieben werden. Eine Bruchpunktpräzisierung erfolgte in 3 Fällen. Im Fall 63 konnten nach MCB die Bruchpunkte identifiziert und der duplizierte Bereich als invertiert vorliegend beschrieben werden.

Nach Analyse der **komplex aberranten Fälle** konnten sowohl **Insertionen** (Fälle 68 - 69), als auch **Translokationen** unter Beteiligung von 3 bzw. 4 Chromosomen (Fall 70, 71) beschrieben werden.

In Fall 68 handelte es sich um die chromosomale Region 1q31.2 - q32, die in den kurzen Arm von Chromosom 1 (1p31.2) in direkter Orientierung (d. h., q31.2 ist ebenfalls proximal zum Zentromer gelegen) inseriert ist.

Im Fall 69 wurde nach Hybridisierung der MCB-Sonden für #1 und #4 festgestellt, daß die Region 4q31.1 - q33 in das Chromosom 1 (in 1q31) in invertierter Richtung inseriert ist. Die Hybridisierungsergebnisse sind in Abb. 3.19 dargestellt.

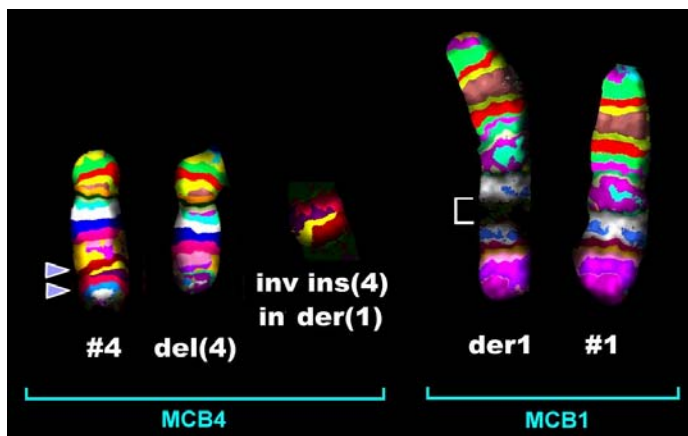


Abb. 3.19

Charakterisierung einer ins(1;4) (q31;q33q31.1) mittels MCB (Fall 69)
Es wurde sowohl MCB #4 als auch MCB #1 in Einzelhybridisierungen eingesetzt. In der linken Bildhälfte ist die chromosomale Region von Chromosom 4 durch Pfeilspitzen markiert, die im Chromosom del(4) fehlt und invertiert in der(1) inseriert ist (rechte Bildhälfte). Diese Region im der(1) wurde mit dem MCB #1 nicht markiert und stellt sich als Lücke dar (durch weiße Klammer markiert).

Die ins(1;4) wurde in Amnionzellen nachgewiesen. Eine Elternuntersuchung ergab, daß es sich dabei um ein *de-novo*-Ereignis in den kindlichen Zellen handelt. Diese Insertion erscheint molekularzytogenetisch balanciert, prognostische Aussagen zum Phänotyp des Kindes sind dennoch schwer möglich.

In beiden komplex aberranten Translokationsfällen konnte erst durch Einsatz molekularzytogenetischer Methoden eine Beschreibung der involvierten Chromosomen erfolgen, und eine exakte Angabe der Bruchpunkte war nach Hybridisierung der entsprechenden MCB-Sonden möglich.

Fall 70 wurde nach GTG-Bänderung folgendermaßen beschrieben:

46,XX,-3,der(6)t(3;6)(q11;p25),der(15)t(3;15)(p11;q26),+mar[13]/45,XX,-3,der(6)t(3;6)(q11;p25),der(15)t(3;15)(p11;q26)[7].

Ein Chromosom 3 war (anscheinend) im Peri-Zentromerbereich gebrochen, und der p-Arm war an Chromosom 15 transloziert, der q-Arm an Chromosom 6. In einigen Metaphaseplatten wurde noch ein Markerchromosom nachgewiesen.

Eine Hybridisierung mit den entsprechenden MCB-Sonden bestätigte das Vorliegen der Translokationen t(3;6) und t(3;15) (Abb. 3.20), mittels der Falschfarben und Profile mußte jedoch eine Korrektur der vorher festgelegten Bruchpunkte vorgenommen werden. So konnte das Translokations-Chromosom t(3;6) wie folgt beschrieben werden: t(3;6)(3qter→3q13.2::3p13→3p12.1::3q13.2→3q12.1 or 3q12.1→3q13.2::6p25→6qter).

Die Region 3p13 - p12.1 war ebenfalls in dieses derivative Chromosom involviert und lag inseriert in 3q13.2 vor (Abb. 3.20). Im Chromosom t(3;15) hingegen war – entgegen der Beschreibung nach GTG – nicht der komplette kurze Arm des Chromosoms 3 vorhanden, sondern nur die Region 3pter - p13 [t(3;15)(3pter→3p13::15q26→15pter)]. Der Marker der(3) konnte als Peri-Zentromerregion von Chromosom 3 identifiziert werden: der(3)(:p12.1→q11.2:). Das Verhältnis der Zellen mit der(3) zu Zellen, in denen das Derivatvchromosom verloren gegangen war, betrug 8 : 6.

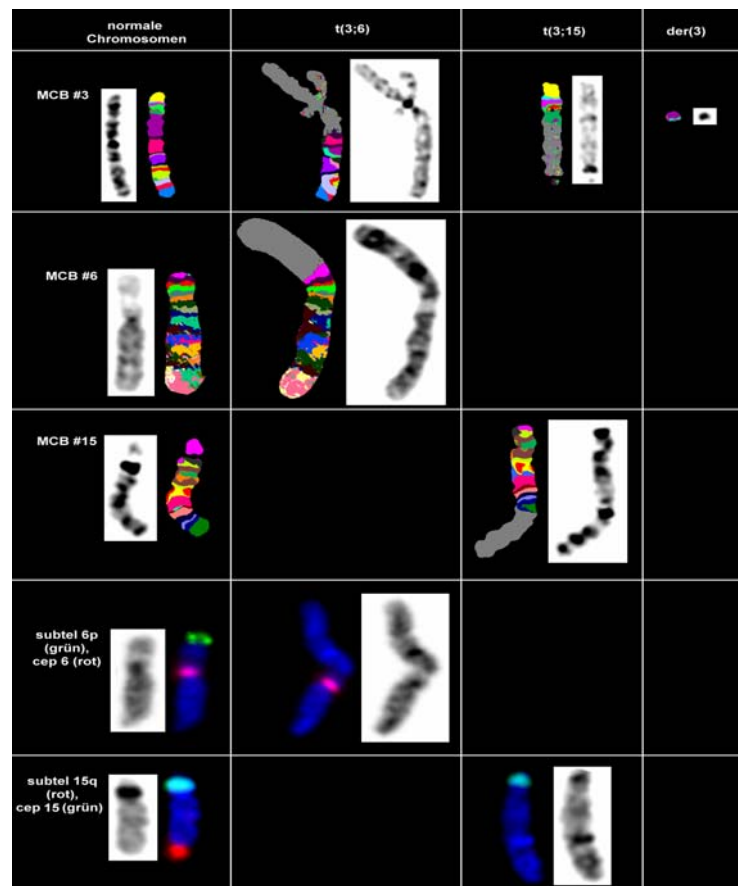
Weitere Hybridisierungen wurden mit dem Sub-Zentromer-Mix für Chromosom 3 sowie Sub-Telomersonden für 3p, 3q, 6p, 6q und 15q durchgeführt. Auf dem Translokationschromosom t(3;6) konnte mit der Sub-Telomersonde für 6p kein Signal nachgewiesen werden (Abb. 3.20), nach Hybridisierung des Sub-Zentromer-Mixes für Chromosom 3 (siehe Material und Methoden, Tabelle 2.3) zeigte sich auf t(3;6) ein Signal mit der Sub-Zentromersonde für 3q (nicht abgebildet). Auf dem Translokationschromosom t(3;15) war weder ein Signal für die Sub-Telomersonde 15q noch für die Sub-Zentromersonde 3p detektierbar. Auf dem Derivatvchromosom der(3) hingegen wurde neben dem Zentromer-Signal für Chromosom 3 ein Signal der zentromernahen Sonde für 3p nachgewiesen.

Abb. 3.20

Aufklärung der Struktur und Identifizierung der Bruchpunkte der aberranten Chromosomen t(3;6), t(3;15) und der(3) mit MCB und lokus-spezifischen Sonden (Fall 70)

In der linken Spalte sind jeweils die normalen Chromosomen dargestellt, nachfolgend die Translokationschromosomen t(3;6) und t(3;15) sowie der(3). Die Falschfarben des MCB für #3, #6 und #15 sowie die Hybridisierungsbilder der Sub-Telomere für 6p und 15q sind abgebildet.

Die Translokationschromosomen in den Spalten 2 und 3 wurden in ihrer Orientierung vom p- zum q-Arm jeweils entsprechend den Normalchromosomen dargestellt.



Im Fall 71 wurden nach konventioneller Analyse komplexe Translokationen zwischen den Chromosomen 2, 4 und 11 beschrieben [46,XX,t(2;4;11)(2qter→2p13::4q21→4qter;4pter→4q21::11p15→11pter;2pter→2p13::11p15→11qter)].

Erst durch den Einsatz von M-FISH konnte noch der 4. Translokationspartner – das Chromosom 1 – identifiziert werden. Eine Korrektur der nach GTG-Bänderung beschriebenen Bruchpunkte erfolgte nach Hybridisierung mit den entsprechenden Multicolor-Bänderungs sonden um 1 - 2 Banden (bezogen auf ein Bandenlevel von 550 Banden pro haploiden Karyotyp). Der Karyotyp konnte daraufhin wie folgt beschrieben werden:

ish t(1;4;2;11)(1pter→1q43::11p14.1→11pter;4pter→4q21.1::1q43→1qter;2qter→2p12-13.1::4q21.1→4qter;11qter→11p14.1::2p12-p13.1→2pter) (Seidel *et al.*, 2003).

In Abb. 3.21 sind die Ergebnisse der M-FISH und MCB-Hybridisierungen dargestellt.

Abb. 3.21

Aufklärung der Struktur und Identifizierung der Bruchpunkte von aberranten Chromosomen eines komplexen Karyotypes (Fall 71) durch M-FISH und MCB

Die obere Zeile enthält die M-FISH Bilder (Falschfarben), in der linken Spalte sind die Falschfarb-Bilder der normalen Chromosomen nach MCB dargestellt.

Die Derivatvchromosomen wurden in ihrer Orientierung vom p- zum q-Arm jeweils entsprechend den Normalchromosomen abgebildet.

Die Spalten werden im folgenden von links nach rechts beschrieben.

In der 2. Spalte [der(1)] ist die t(1;11) zu sehen. Das Chromosom der(2) [Spalte 3] entstand durch eine Translokation der Chromosomen 2 und 4. In Spalte 4 [der(4)] ist gezeigt, daß sich der terminale Bereich von Chromosom 1 an Chromosom 4 befindet. Das derivative Chromosom 11 [der(11)] entstand durch eine Translokation chromosomaler Abschnitte von 2 und 11.

M-FISH MCB	der(1)	der(2)	der(4)	der(11)
MCB 1				
MCB 2				
MCB 4				
MCB 11				
karyotype	der(1)t(1;11) (q43;p14.1)	der(2)t(2;4) (p12 or 13.1;q21.1)	der(4)t(1;4) (q43;q21.1)	der(11)t(2;11) (p12 or 13.1;p14.1)

3.3.2.2 Tumorspezifische Aberrationen

In Tabelle 8.7 sind die Fälle mit erworbenen chromosomalen Rearrangements zusammengestellt, in welchen erst durch MCB-Analysen eine Charakterisierung der Bruchpunkte möglich war bzw. nach GTG-Bänderung beschriebene Aberrationen korrigiert oder in der Bandendefinition „verfeinert“ wurden. Es wurden Translokationen (Fälle 72, 73, 86, 89, 90, 94, 95, 97, 98) und Inversionen (Fälle 87, 95), Deletionen (75 - 85, 88, 89, 91 - 93,

96, 98) sowie ein Isochromosom 3q (Fall 74) und ein komplexeres Aberrationsgeschehen mit einer Insertion (Fall 93) untersucht.

Exemplarisch wird hier Fall 93 vorgestellt.

Bei einer Patientin mit einer Philadelphia-negativen CML wurde nach GTG-Bänderung ein verlängertes und ein extrem verkürztes Chromosom 5 beschrieben (Heller *et al.*, 2002). Aussagen zur Art der vorliegenden Aberrationen konnten anhand der Schwarz-Weiß-Bänderung der Chromosomen nicht getroffen werden. Durch M-FISH mit wcp-Sonden wurde ausgeschlossen, daß weitere Chromosomen in die Formierung der Derivatvchromosomen involviert sind. Nach MCB für Chromosom 5 konnte eine Deletion und eine Insertion der Chromosomen 5 beschrieben werden (Abb. 3.22), und eine Definition der Bruchpunkte war wie folgt möglich:

ish del(5)(pter→q12::q33→qter),ins(5)(pter→q15::q12→q21::q21→qter).

Diese Veränderungen resultieren also aus einer Deletion im langen Arm eines Chromosoms 5 (5q12 - q33), wobei ein Teil dieses deletierten Fragments im anderen Chromosom 5 inseriert vorliegt (5q12 - q21 ist in Bande 5q15 inseriert). Eine partielle Deletion konnte insgesamt für den Bereich 5q21 - q33 nachgewiesen werden (Abb. 3.22).

Abb. 3.22

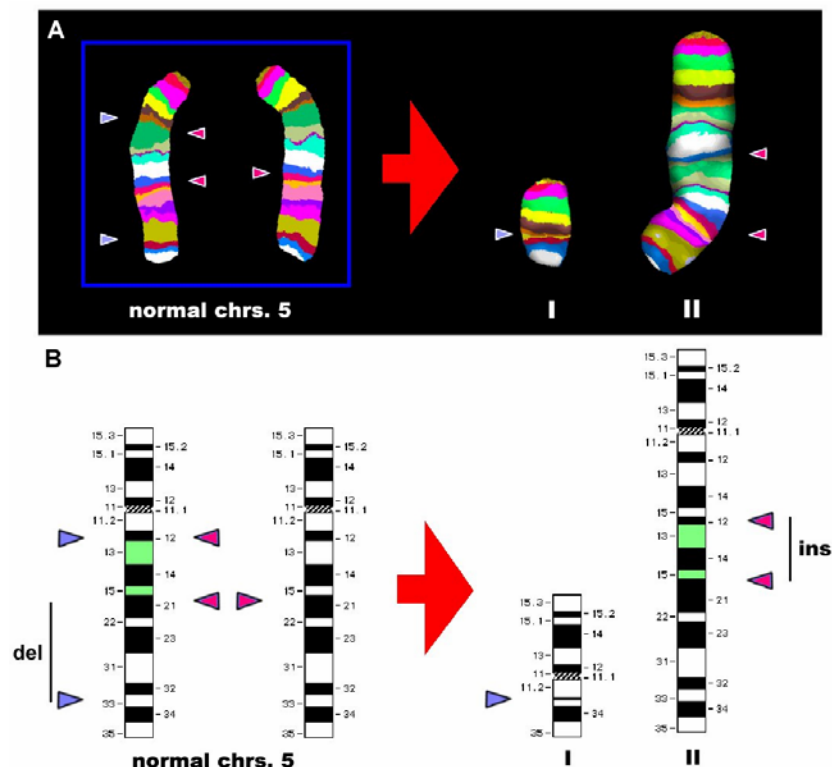
Struktur und Bruchpunkte zweier derivativer Chromosomen 5 (Fall 93)

(A) Die Falschfarben nach MCB #5 sind dargestellt. Zwei unauffällige Chromosomen 5 mit normalen MCB-Bandenmuster sind in dem blau umrandeten Kästchen zu sehen. Zwei Brüche und eine Fusion in 5q12 und q33 (durch blaue Pfeilspitzen links der Chromosomen markiert) führen zu dem derivativen Chromosom I. Ein weiterer Bruch in dem deletierten Fragment muß stattgefunden haben (in 5q21, untere rote Pfeilspitze im linken Chromosom).

Während der distale Teil

(5q21-q33) verloren gegangen ist, konnte eine Insertion des proximalen Teiles (5q12-21) in das andere Chromosom in 5q15 (rote Pfeilspitze im rechten Chromosom) gezeigt werden (Chromosom II).

(B) Die beschriebenen Aberrationen sind schematisch anhand der Ideogramme dargestellt.



Bisher konnten komplex rearrangierte Karyotypen nur ungenügend mit den (routine-diagnostisch) zur Verfügung stehenden Methoden beschrieben werden und Aussagen zu den involvierten Bruchpunkten waren meist nicht möglich.

Durch Multicolor-Bänderung steht nun ein Verfahren zur Verfügung, welches die Beschreibung des Karyotyps und die Identifizierung der Bruchpunkte erlaubt. Die Anwendung geeigneter MCB-Banken setzt jedoch die Kenntnis der in die Aberration(en) invol-

vierten Chromosomen voraus. Eine günstige Strategie ist deshalb, sich durch M-FISH-Untersuchungen mit wcp-Sonden einen Überblick über den zu analysierenden Karyotyp zu verschaffen. Weiterhin können dadurch erste Aussagen zur Klonalität der zu untersuchenden Zellpopulation getroffen werden (siehe Tabelle 8.7, Fall 94). Anschließend sollten durch MCB-Untersuchungen die involvierten Bruchpunkte charakterisiert werden (siehe Tabelle 8.7, Fall 97 und 98).

Auf die Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchungen im Fall 97 wird näher eingegangen (Heller *et al.*, 2003 *in press-b*). Nach GTG-Bänderung wurde bei einem Patienten mit einer *de-novo*-Tumornekrosefaktor- α -Rezeptor-1 assoziierten juvenilen chronischen Arthritis ein hochkomplex veränderter Karyotyp nachgewiesen. Zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion lag bei dem Patienten klinisch bereits ein Übergang in eine therapieassoziierte AML vor. Durch eine M-FISH-Analyse war es möglich, die Chromosomen zu identifizieren, welche in die Formierung der 4 Markerchromosomen involviert waren (Abb. 3.23 A) – Aussagen zu den chromosomalen Bruchpunkten konnten nicht getroffen werden. Durch Einsatz der MCB-Sonden #5, #6, #7, #12, #13 und #19 war eine Charakterisierung der Derivatchromosomen möglich. Weiterhin wurden noch Zentromer-Sonden (cep 6, 7, 12, 13, 19) und die midi 54-Sonde eingesetzt (Abb. 3.23 B).

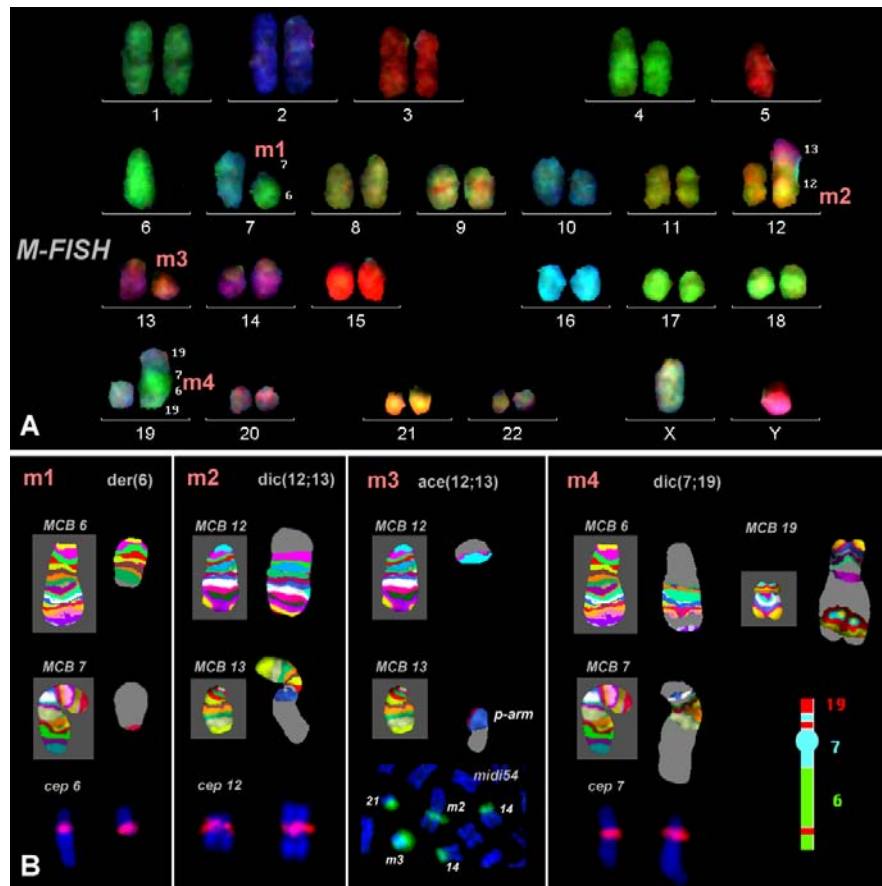


Abb. 3.23

Struktur der Chromosomen mit komplex verändertem Karyotyp (Fall 97)

(A) Durch M-FISH konnten 4 Marker (m1 - m4) identifiziert und deren chromosomale Zusammensetzung beschrieben werden. Bei m3 wurde nach M-FISH ausschließlich Material von Chromosom 13 vermutet. (B) Die Falschfarben nach MCB der Chromosomen 6, 7, 12, 13, und 19 und weiteren Hybridisierungen mit Zentromer-Sonden der Chromosomen 6, 7 und 12 sowie der midi 54 sind für die Marker m1 - m4 dargestellt. In den mit grau unterlegten Kästchen sind die Falschfarben der jeweiligen normalen Chromosomen gezeigt. Der Marker m4 (rechte Bildhälfte) wurde zusätzlich noch schematisch dargestellt.

Die Karyotypveränderungen konnten nach der molekularzytogenetischen Analyse wie folgt beschrieben werden:

ish 44,XY,-5,der(6)t(6;7)(6pter→6q12::7p22.2→7pter or 7pter→7p22.2),dic(7;19)t(6;19;6;7;19;7;19)(19qter→19q12::7p13→7p11.1::19q12→19p12 or 19p12→19q12::7p11.1→7q21.3::6q12→6q26::19p13.3→19p12::6q26→6qter),dic(12;13)(13qter→13p11.2::12p13.1→12qter),ace(12;13)(13pter→13p11.2::12p13.1→12pter),-19.

Zusammenfassende Betrachtung zu 3.1.1 – 3.3.2

Die unter den Punkten 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Fälle (siehe Tabellen 8.4 - 8.7 im Anhang) gliedern sich wie folgt auf: in 9 Fällen wurden Amnion- bzw. Chorionzellen, in 37 Fällen Lymphozytensuspensionen untersucht, in 52 Fällen lagen Knochenmarksusensionen vor.

Die Fälle mit **konstitutionellen Veränderungen** waren zu 91 % als einfach aberrant zu beschreiben (42 Fälle), 9 % (4 Fälle) waren komplex aberrant. In 16 Fällen (35 %) konnte der nach GTG-Bänderung erhobene Befund bestätigt werden, in 12 Fällen (26 %) erfolgte eine Korrektur der Bruchpunkte und in weiteren 18 untersuchten Fällen (39 %) konnte erst nach Einsatz der molekularzytogenetischen Methoden eine Charakterisierung der Aberrationen vorgenommen werden.

In diesem Kollektiv wurde in 14 Fällen eine klinische Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp nachgewiesen. In weiteren 12 Fällen war eine klinische Korrelation nicht sicher gegeben, und in 12 Fällen lagen keine (vollständigen) Angaben zur Klinik bzw. dem Grund der chromosomalen Analyse vor. In 8 der involvierten Fälle wurde die gleiche chromosomale Veränderung der Indexpatienten auch bei einer Elternuntersuchung nachgewiesen, die jeweiligen Träger der Aberration waren dabei ohne klinische Auffälligkeiten.

Bei den Untersuchungen **tumorspezifischer Veränderungen** konnten 35 Fälle (67 %) als einfach aberrant beschrieben werden, in 17 Fällen (33 %) lagen komplex aberrante Karyotypen vor. Nach der molekularzytogenetischen Analyse konnte in 16 Zellsuspensionen (31 %) der nach GTG-Bänderung beschriebene Karyotyp bestätigt werden, in 17 Untersuchungen (33 %) mußte eine Korrektur der Bruchpunkte vorgenommen werden, und in 19 Fällen (36 %) war erst danach eine Charakterisierung der Aberration(en) und eine Beschreibung der Bruchpunkte möglich.

Die Identifizierung und Beschreibung von Karyotypveränderungen in malignen hämatologischen Erkrankungen sind ein initialer Teil der Diagnose und haben in vielen Fällen eine prognostische Bedeutung. Wie hier gezeigt werden konnte, eignet sich die Methode des MCB sehr gut, diese Karyotypveränderungen zu erfassen und ermöglicht dadurch eine Beurteilung der an den Aberrationen beteiligten Bruchpunkte. Es wurden verschiedene Aberrationen untersucht, so z. B. die inv(3)(q21q26); t(3;3)(q21;q26); inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), die bekannte Aberrationen des MDS oder der AML sind (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology –*edb1*). Partielle Monosomien der langen Arme der Chromosomen 5, 7 und 13, die aus Deletionen resultieren, sind bekannte Befunde, die mit neoplastischen Erkrankungen der myeloischen Zellreihe einher gehen. Diese Aberrationen wurden auch in dem hier untersuchten Kollektiv bei MDS, AML, CML und JMML-Patienten nachgewiesen (z. B. Fälle 9, 10, 39, 42, 76 - 85, 88). Es konnten weiterhin Bruchpunkte identifiziert werden, die bis dato in hämatologischen Erkrankungen beschrieben wurden, aber entweder in anderen klinischen Entitäten oder mit anderen Translokationspartnern vorkommen. So wurde der Bruch in 13q14.2 (Fall 12 – AML M1) bisher nur bei lymphatischen Malignomen nachgewiesen. Weitere Bruchpunkte, z. B. 7p21 und 7q21.3 (Fall 87 – T-ALL), wurden bisher nicht in Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen beschrieben.

Numerische Chromosomenaberrationen als alleinige Veränderungen in malignen Zellen wurden in einer Vielzahl von Untersuchungen nachgewiesen. Potentielle kryptische Aberrationen konnten mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden der Chromosomen-Bänderung jedoch nicht erfaßt werden.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob mit der neuen Methode des MCB ein Verfahren zur Verfügung steht, mit dem es möglich ist, bis dato kryptische Aberrationen und die darin involvierten Bruchpunkte zu identifizieren und mögliche Unterschiede in tri- oder tetrasomen Tumorzellpopulationen zu beschreiben.

3.3.3 Fälle mit einer Trisomie 8 lassen mittels MCB für Chromosom 8 keine Aberration erkennen

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Rohdaten wurden zum Teil von Dr. L. Brecevic im Rahmen eines von der Sander-Stiftung geförderten Projektes und weiterhin von M. Glaser im Rahmen eines von der Promovierenden betreuten Großpraktikums erhoben.

Es wurden Zellsuspensionen von Patienten mit einer myeloischen Erkrankung retrospektiv untersucht, in welchen nach GTG-Bänderung Metaphaseplatten mit Trisomie bzw. Tetrasomie 8 nachweisbar waren. In die Studie waren sowohl Patienten integriert, die eine Trisomie 8 als alleinige Aberration aufwiesen, als auch Patienten, die neben einer Trisomie 8 noch strukturelle Veränderungen anderer Chromosomen zeigten (Tab. 8.8). Mit der MCB-Technik konnten in den untersuchten Metaphaseplatten jeweils 20 Banden pro Chromosom 8 erzielt werden (Abb. 3.24), was einer Auflösung von 510 Banden pro haploiden Chromosomensatz entspricht (Heller *et al.*, 2003-*in press a*).

Acht Fälle wurden untersucht, in welchen eine Trisomie 8 als alleinige Aberration vorlag. Die Zahl der untersuchten Metaphaseplatten mit Trisomie 8 lag zwischen 2 (Fall 105) und 172 (Fall 104). Im Fall 101 wurde eine Metaphaseplatte mit einer Tetrasomie für das Chromosom 8 gefunden. Nach Vergleich sowohl der Echtfarben, der Fluorochromprofile und der Falschfarben ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer chromosomalen Aberration in den analysierten Chromosomen 8.

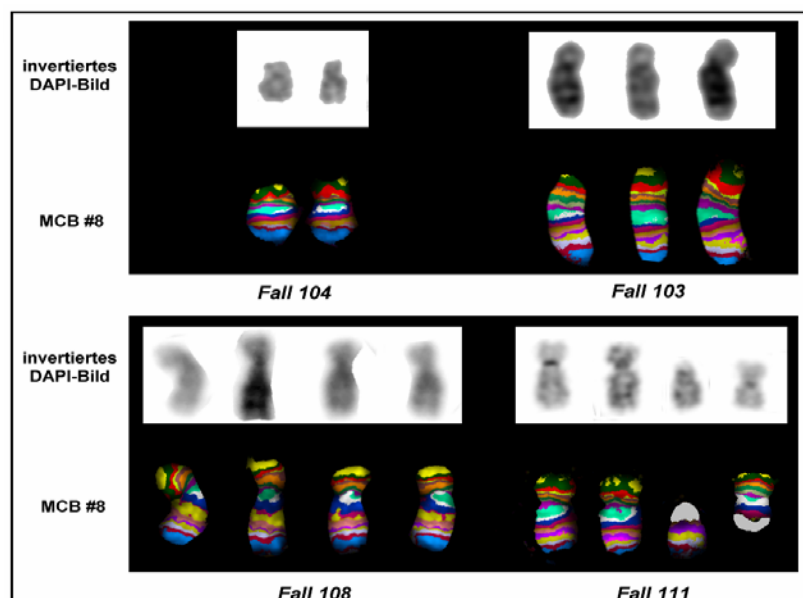
Fünf Fälle (Fall 107 - 111) wurden untersucht, die neben einer Trisomie (oder Tetrasomie) 8 noch zusätzliche strukturelle Aberrationen anderer Chromosomen aufwiesen (siehe Tab. 8.8). Die Zahl der analysierten Platten mit Trisomie 8 lag zwischen 7 und 45. Im Fall 108 konnten 12 Metaphaseplatten identifiziert werden, in denen jeweils eine Tetrasomie für Chromosom 8 vorlag.

Nach Auswertung der im jeweiligen Fall zur Verfügung stehenden Hybridisierungsbilder fand sich kein Hinweis auf das Vorliegen einer kryptischen chromosomalen Aberration eines der Chromosomen 8.

Abb. 3.24

Vier repräsentative Fälle der MCB #8-Studie mit Di-, Tri- und Tetrasomie sowie einer Strukturaberration der Chromosomen 8

Es sind invertierte DAPI-Bilder und die entsprechenden Falschfarben dargestellt. Im Fall 104 wurde nach GTG-Bänderung eine Bandenauflösung von 150 Banden, nach MCB ca. 500 Banden pro haploiden Karyotyp erreicht. Im Fall 111 wurde mit MCB #8 eine Translokation t(8;21) bestätigt.



3.4 Eingrenzung der Bruchregionen einer t(16;21) mittels MCB und Nachweis einer FUS/ERG-Genfusion

Eine weiterführende molekulargenetische Analyse, z. B. die Suche nach einer möglichen Genfusion, ist erst dann denkbar, wenn die chromosomale Zusammensetzung der an einer Aberration beteiligten Chromosomen aufgeklärt ist und die involvierten Bruchpunkte bekannt sind. An dem nun folgenden Fall soll die prinzipielle Strategie einer Charakterisierung von Bruchpunkten bis auf Genebene (im speziellen Fall: Nachweis einer Genfusion) nach chromosomaler Bruchpunktbeschreibung mittels MCB dargestellt werden.

Nach der GTG-Analyse von Knochenmarkchromosomen eines 22 jährigen Patienten mit einer c-ALL (Fall 48, siehe Anhang Tabelle 8.6) wurde ein verkürztes Chromosom 16 sowie ein vergrößertes Chromosom 21 beschrieben. Nach der Hybridisierung mit MCB-Sonden für die Chromosomen 16 und 21 konnte die Translokation folgendermaßen beschrieben werden: t(16;21)(p11;q22) (Abb. 3.25). Eine M-FISH Hybridisierung wurde angeschlossen, um mögliche zusätzliche Aberrationen sichtbar zu machen. Es wurde eine weitere unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen X und 4 identifiziert, die nach GTG-Bänderung nicht genau beschrieben werden konnte, und der Karyotyp lautet: 46,XY,t(16;21)(p11;q22).ish der(4)t(X;4)(p22.??;p16),t(16;21)(p11;q22).

Eine Recherche im „*Catalog of chromosome aberrations in cancer*“ (Mitelman, 1998) und im „*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*“ (edb1) erbrachte keine Hinweise auf eine frühere Beschreibung der unbalancierten Translokation der Chromosomen X und 4 bezüglich hämatologischer Malignome.

Die t(16;21)(p11;q22) ist hingegen als eine Aberration beschrieben, die mit einer Genfusion der Gene *TLS/FUS* (im folgenden nur *FUS* genannt) und *ERG* einhergeht (siehe Abb. 3.27). Daraufhin wurde überprüft, ob auch in Fall 48 eine *FUS-ERG*-Genfusion vorliegt.

Aus fixierten Zellen konnte RNA präpariert werden, die in c-DNA umgeschrieben wurde. Eine *Nested-PCR* mit den Primern 4F1 und T1 (binden im *FUS*-Gen) und 8R und E2 (binden im *ERG*-Gen) (siehe Abb. 3.26) ergab ein 383 bp langes Produkt. Eine Sequenzierung des Fragments in beide Richtungen (Sequenzdaten siehe Anhang Abb. 8.2) und ein Datenbankvergleich (edb7) ergab eine 100 %ige Sequenzhomologie mit der *FUS*-Gensequenz von Nukleotid 817 bis 877 (Accession Nr: NM_004960) und der *ERG*-Gensequenz von Nukleotid 590 bis 762 (Accession Nr: M21535) mit bekannten Sequenzen von *FUS* und *ERG*.

Ein Vergleich der gefundenen Genfusion mit den publizierten Daten ließ erkennen, daß eine bis dato nicht beschriebene Exonfusion zwischen Exon 7 des *FUS*-Gens und Exon 8 des *ERG*-Gens vorliegt (Abb. 3.27, siehe Diskussion).

Die Sequenzanalyse (NCBI-Datenbank –edb5) ergab einen durchgehenden offenen Leserahmen.

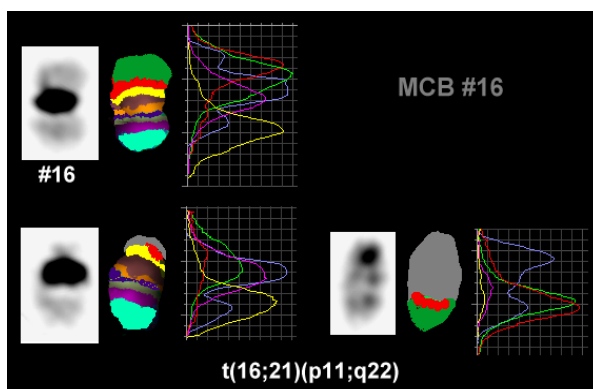


Abb. 3. 25
Identifizierte Bruchpunkte nach MCB #16 (Fall 48)

Nach Hybridisierung mit MCB #16 konnte die Translokation wie folgt beschrieben werden: ish t(16;21)(p11;q22).

Im oberen Bildabschnitt sind invertiertes DAPI-Bild und Falschfarben des normalen #16 zu sehen, in der unteren Bildhälfte sind die derivativen Chromosomen 16 und 21 dargestellt. Grau unterlegt sind die jeweils nicht markierten Bereiche des Chromosom 21.

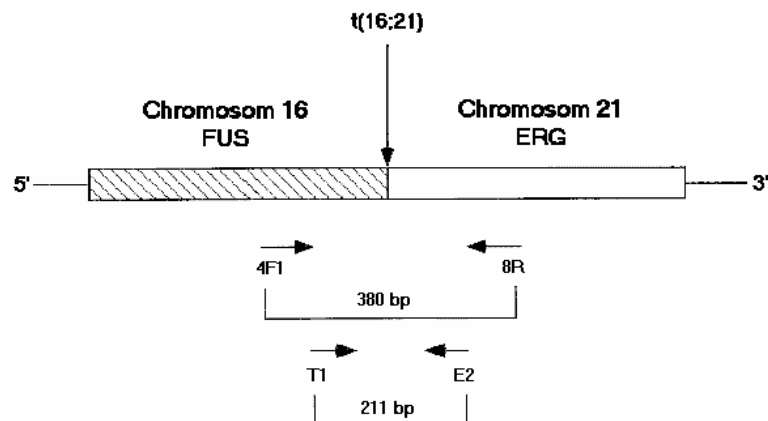
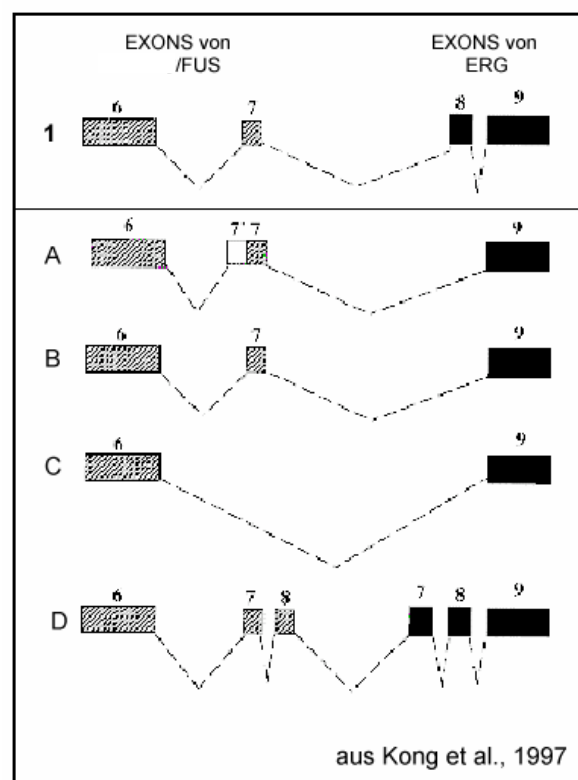


Abb. 3.26
Schematische Darstellung des t(16;21)-spezifischen Transkriptes und der Lokalisation der eingesetzten Primer

aus Kong et al., 1997

Abb. 3.27
Schematische Darstellung der gefundenen *FUS/ERG* Exonfusion (1) im Vergleich zu den bekannten Exonvarianten (A-D)
(Kong et al., 1997)

Die schraffierten Kästchen repräsentieren dabei *FUS*-Exon Sequenzen, die schwarzen Kästchen stellen die *ERG*-Exon Sequenzen dar. Die Zahlen über den Kästchen entsprechen den Exons der jeweiligen Gene.



aus Kong et al., 1997

3.5 Grenzen der MCB-Methode

3.5.1 Nicht eindeutig charakterisierbare Fälle

In Tabelle 8.9 wurden die Fälle aufgelistet, bei denen nach Hybridisierung der entsprechenden MCB-Sondenmixe kein eindeutiges oder kein Ergebnis erzielt werden konnte bzw. eine Übereinstimmung mit dem GTG-Ergebnis nicht möglich war.

Die hier beschriebenen Fälle können wie folgt eingeordnet werden:

- Fälle mit kleinen Deletionen (Fälle 112 - 115)
- Fälle, bei welchen nach GTG-Bänderung fraglich war, ob eine Aberration vorliegt (Fälle 116 - 122) und
- Fälle, die durch unterschiedliche Zellklone charakterisiert waren (Fälle 123, 124).

In den Lymphozyten eines noch sehr jungen Patienten mit klinischen Auffälligkeiten (Fall 112) wurde nach der GTG-Bänderung eine Translokation $t(3;21)(q21;q22.3)$ *de-novo* beschrieben. Nach Hybridisierung der MCB-Mixe für #3 und #21 konnte im Chromosom 3 keine eindeutige Bruchpunktzuweisung erfolgen, die chromosomalen Banden 3q21 oder 3q23 wurden angegeben. Parallel zu der MCB-Untersuchung führte Dr. H. Tönnies, Berlin, eine CGH-Analyse durch und konnte im Chromosom 3 eine Deletion in 3q22 - q23 nachweisen. Die deletierte Region entspricht dabei genau dem Bereich, der nach MCB nicht eindeutig beurteilt werden konnte. Ein Zusammenhang zwischen den beschriebenen klinischen Auffälligkeiten des Patienten und dem aberranten Karyotyp ist wahrscheinlich. Eine Deletion der Telomerregion im langen Arm von Chromosom 4 konnte in Fall 113 erst dann nachgewiesen werden, als die MCB-Sonde #4 mit einer Subtelomer-Sonde für 4q kombiniert wurde. Eine eindeutige Aussage bezüglich der Deletion mit dem MCB-Mix alleine war in diesem Fall nicht möglich.

Das Vorliegen einer Deletion in 10q26 (Fall 114) wurde nach Auswertung der Fluorochromprofile und Falschfarb-Banden für MCB #10 vermutet, konnte aber nicht in allen untersuchten Chromosomen 10 sicher nachgewiesen werden.

Im Fall 115 wurde durch YAC-Sonden eine Deletion in 8p23.1 bestätigt (mündliche Mitteilung von Dr. M. Volleth, Magdeburg), die nach Hybridisierung mit dem MCB #8-Mix nicht identifiziert werden konnte.

In den Fällen 116 und 117 wurden nach Giemsa-Bänderung fragliche Bandenabfolgen in den kurzen Armen der Chromosomen 16 bzw. 17 beschrieben, die allerdings keinem bestimmten Aberrationsmuster zuzuordnen waren. Die daraufhin durchgeführte MCB-Analyse mit den entsprechenden Chromosomen zeigte in beiden Fällen eine regelrechte Signalverteilung und ließ die Beschreibung einer Aberration nicht zu.

In 5 weiteren Knochenmarksuspensionen (Fälle 118 - 122) wurden ebenfalls fragliche Bandenabfolgen nach der Giemsa-Bänderung beschrieben, auch in diesen Fällen konnte nach Hybridisierung der entsprechenden Sondenmixe keine auffällige Signalkonstellation der jeweiligen Chromosomen nachgewiesen werden.

In Knochenmarkzellen einer Patientin mit einer AML M2 (Fall 123) wurde nach GTG-Bänderung eine Inversion im langen Arm von Chromosom 3 beschrieben. Eine Hybridisierung der MCB-Sonde #3 auf Metaphaseplatten der Patientin ließ jedoch keine Aberration erkennen. In einem weiteren Fall (124) wurde ebenfalls eine $inv(3)$ vermutet, auch hier war es nicht möglich, in den untersuchten Metaphaseplatten nach MCB #3 eine abweichende Signalverteilung zu detektieren.

3.5.2 Robertsonsche Translokationen lassen durch FISH mit spezifischen Sonden der acro-p11-Region konservierte Bruchpunkte erkennen

MCB-Untersuchungen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen sind aufgrund ihres Gehalts an repetitiver DNA und der dadurch resultierenden Sequenzhomologien nicht möglich und sind dadurch „Grenzfälle“ für den Einsatz der MCB-Methode.

Eine Charakterisierung der p-Arme dieser Chromosomen kann durch spezifische Plasmidsonden erfolgen.

Robertsonsche Translokationen – *de-novo* entstandene chromosomale Rearrangements zweier akrozentrischer Chromosomen - stellen eine geeignete Zielgruppe für die Untersuchung der molekularen Mechanismen ihrer Entstehung dar. In einem ersten Schritt erfolgt deshalb die Charakterisierung der chromosomalen Bruchpunkte.

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden im Rahmen eines von Boehringer Ingelheim Fonds geförderten 2-monatigen-Forschungsaufenthaltes im Labor von Prof. Dr. L.G. Shaffer, Department of Molecular and Human Genetics am Baylor College of Medicine, Houston, USA, durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden 17 Fälle mit rob(13;14) und 4 Fälle mit rob(14;21) mit spezifischen Plasmidsonden untersucht (Bandyopadhyay *et al.*, 2002) (Tab. 8.10).

Folgende, über Nick-Translation markierte Plasmide wurden eingesetzt:

- pTRS-47 ist lokalisiert in der p11-Region von Chromosom 14 und 22 und enthält DNA der Satelliten-III-Subfamilie (Choo *et al.*, 1990)
- DNA der Satelliten-III-Subfamilie ist ebenfalls in Klon pTRS-63 enthalten; er hybridisiert in 14p11 distal zum Plasmid pTRS-47 (Choo *et al.*, 1992)
- pTRI-6 enthält DNA der Satelliten-I-Subfamilie (Kalitsis *et al.*, 1993) und ist spezifisch für Chromosom 13 in p11 und Chromosom 21p
- pU 6.2 markiert die 18S r-RNA, welche sich in der Region p12 aller akrozentrischen Chromosomen befindet (Wilson *et al.*, 1978).

Um die Identifikation der Translokationschromosomen in der Metaphaseplatte zu erleichtern, wurden zur Hybridisierung Subtelomersonden für die Chromosomen 13q, 14q oder 21q eingesetzt. Folgende Sonden wurden jeweils kombiniert:

Set 1: pTRS-47, pTRS-63 und Subtelomer 14q oder 21q

Set 2: pTRI-6, pU 6.2 und Subtelomer 13 q oder 21q.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.10 zusammengestellt.

Alle Translokationschromosomen rob(13;14) waren positiv für das Plasmid pTRI-6 auf Chromosom 13 und die Translokationschromosomen rob(14;21) zeigten ein Signal auf dem Chromosom 21, während die r-DNA-Sequenzen (Sonde pU 6.2) in den an der Translokation beteiligten akrozentrischen Chromosomen deletiert waren (Abb. 3.28 A, C). In den an der Translokation beteiligten Chromosomen 14 konnten jeweils keine Signale für das Plasmid pTRS-63 nachgewiesen werden, wobei mit Sonde pTRS-47 in allen Fällen ein Signal sichtbar war (Abb. 3.28 B, D).

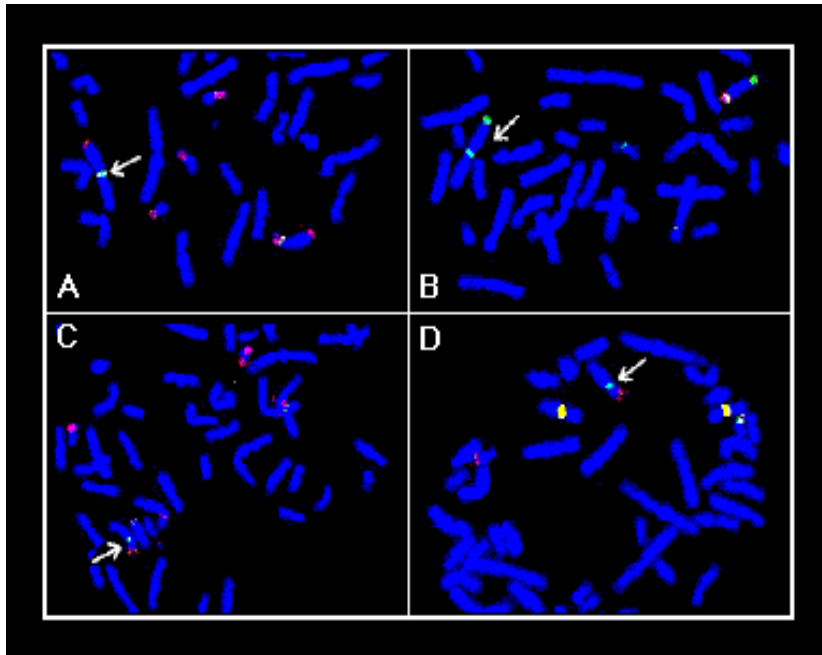


Abb. 3.28
Signalverteilung in Robertsonischen Translokationschromosomen mit spezifischen Sonden der Satelliten-DNA Unterfamilien der Region p11

Es sind jeweils partielle Metaphaseplatten dargestellt. Die Translokationschromosomen sind durch Pfeile markiert.

Bilder A, B entsprechen Fall 132 mit einer rob(13;14); Bilder C und D entsprechen Fall 145 mit einer *de-novo* rob(14;21). (A) pTRI-6 (grün), pU6.2 (rot) und subtel 13q (rot) wurden hybridisiert. Der Bruchpunkt liegt zwischen

der Sonde pTRI-6 (Signal noch vorhanden) und pU6.2 (rDNA). (B) Die Sonde pTRS-47 (grün) kann noch auf dem rob(13;14) nachgewiesen werden, pTRS-63 (rot) ist deletiert, subtel14q (grün) markiert das Robertsonische Chromosom. (C) FISH mit pTRI-6 (grün) und einer r-DNA-Sonde (pU6.2, rot) zeigt, daß der Bruchpunkt zwischen pTRI-6 und pU6.2 liegt. Subtel 21q ist rot markiert. (D) Nach Hybridisierung der Sonden pTRS-47 (grün), pTRS-63 (rot) und subtel 21q (rot) zeigte sich, daß der Bruchpunkt zwischen pTRS-47 und pTRS-63 liegt. Die Sonden pTRS-47 und pTRS-63 führen auf dem Chromosom 9 zu Kreuzhybridisierungen (gelbe Signale).

3.6 Durch MCB sichtbare Unterschiede in der Bruchpunktverteilung bei konstitutionellen und tumorspezifischen Aberrationen

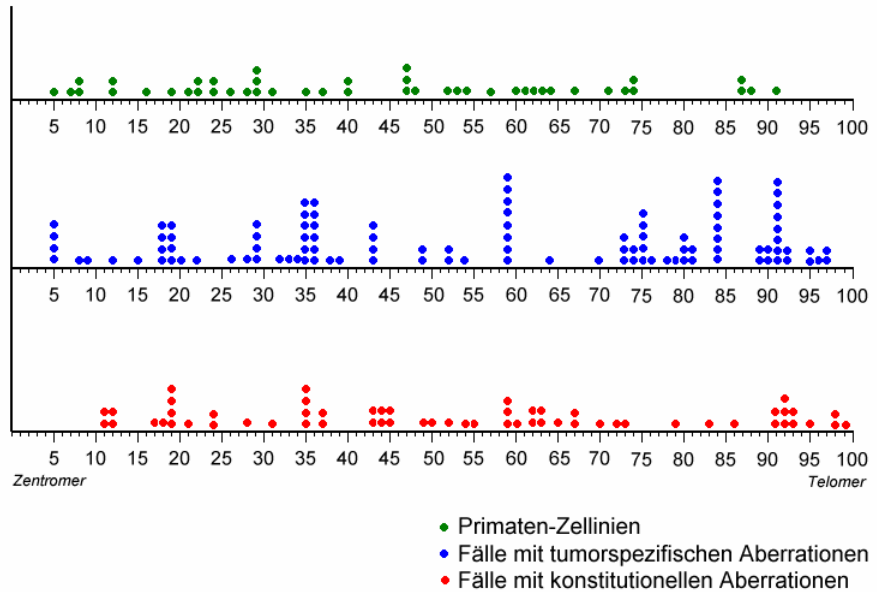
Eine weiterführende Beurteilung der mittels MCB und anderen molekularzytogenetischen Methoden beschriebenen Bruchpunkte wurde mit dem Ziel vorgenommen, Unterschiede der Bruchpunktverteilung zwischen konstitutionellen und tumorspezifischen Aberrationen aufzuzeigen.

In einem 1. Schritt erfolgte dabei eine Beurteilung der Bruchpunktlokalisation entlang der Chromosomenarme. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Bruchpunkte konstitutioneller Aberrationen, die jeweils auf den q-Armen der Chromosomen lagen, wurden dabei grafisch mit ihrer relativen Lage im Chromosomenarm auf einer Skala von 1 - 100 aufgetragen (Abb. 3.29). Ausgenommen waren dabei Brüche im Zentromer bzw. in der heterochromatischen Region. Vergleichend dazu wurde die Verteilung der Bruchpunkte in den Tumor-Fällen und bei den untersuchten Primaten-Zelllinien dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei konstitutionellen Aberrationen in den langen Armen der Chromosomen 60 Bruchpunkte und bei tumorspezifischen Aberrationen 105 Bruchpunkte beschrieben. Nach MCB-Analyse der GGO- und HLA-Chromosomen wurden 45 Bruchpunkte, im q-Arm gelegen, identifiziert.

Es konnte innerhalb der 3 miteinander verglichenen Entitäten eine relative Gleichverteilung der Bruchpunkte im Chromosomenarm festgestellt werden (Abb. 3.29).

Abb. 3.29

Alle in dieser Arbeit mittels MCB ermittelten Bruchpunkte, die in den langen Armen der Chromosomen lagen, wurden mit ihrer relativen Lage im q-Arm aufgetragen



Weitere Vergleiche bezogen die Bruchpunkte, sowohl des p- als auch des q-Arms der Chromosomen, bezüglich ihrer Lage in GTG-positiven oder –negativen Banden ein. Auch hier wurden die Bruchpunkte konstitutioneller Aberrationen mit den beschriebenen Aberrationen in den Tumor-Fällen verglichen. Es erfolgte gleichzeitig eine Erfassung der Bruchpunktlage in den in dieser Arbeit untersuchten Primaten-Zelllinien (Abb. 3.30). Brüche im Zentromer bzw. in der heterochromatischen Region wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Auffallend war in den Fällen mit konstitutionellen Aberrationen eine Häufung der Bruchpunkte in den Giemsa-negativen Banden, wobei 64 der 88 erfaßten Bruchpunkte (73 %) in Giemsa-negativen Regionen lokalisiert waren. In den Fällen mit tumorspezifischen Aberrationen lagen 63 Bruchpunkte (47 %) in Giemsa-positiven Banden, 72 Bruchpunkte (53 %) lagen in Giemsa-negativen Banden. In den GGO- und HLA-Chromosomen wurden insgesamt 69 Bruchpunkte identifiziert, dabei waren 36 Bruchpunkte (52 %) in Giemsa-negativen Banden und 33 Bruchpunkte (48 %) in Giemsa-positiven Banden lokalisiert.

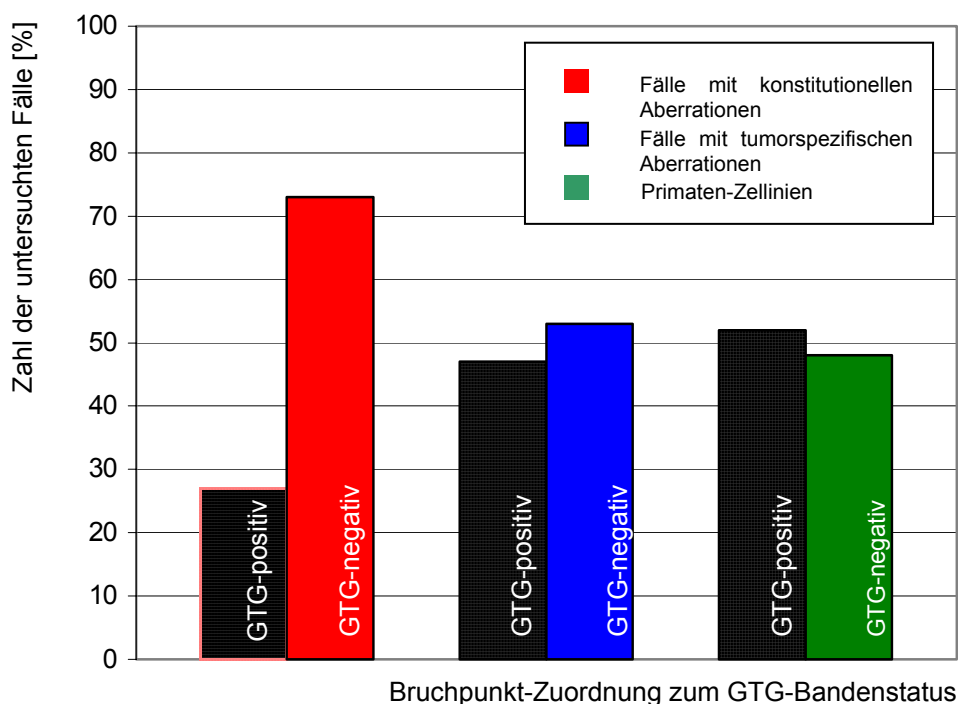


Abb. 3.30
Zuordnung der mittels MCB charakterisierten Bruchpunkte zu GTG-positiven und GTG-negativen Banden

4 Diskussion

Die Diskussion ist in 2 Teile gegliedert. Im 1. Teil werden die angewandten Methoden und anschließend die durch sie erzielten Ergebnisse bei Bruchpunktanalysen diskutiert.

4.1 Multicolor-Bänderungstechniken

Durch die Etablierung von Multicolor-Bänderungsmixen wurden Sonden verfügbar, die eine Charakterisierung chromosomaler Bruchpunkte auf Sub-Bandenlevel ermöglichen.

4.1.1 Eigenschaften des auf Mikrosezierungssonden basierenden MCBs

Es wurden für alle 24 menschlichen Chromosomen MCB-Sondenmixe – basierend auf Mikrosezierungssonden – konstruiert (Liehr *et al.*, 2002). Bei der Herstellung der Mikrosezierungsbanken erwies sich ein etwas „ungenaueres“ Schneiden der Fragmente als günstig, da so eine annähernd Gaußsche Verteilung der resultierenden Fluoreszenzsignale erzielt werden konnte. In den dadurch entstehenden „Randbereichen“ ergeben sich somit andere Fluoreszenzintensitäten, denen mit Hilfe der angewandten Software weitere Falschfarb-Banden zugeordnet werden können. Die Herstellung überlappender Mikrosezierungsbanken gewährleistet zudem eine lückenlose Abdeckung des gesamten Genoms, und eine Beurteilung aller chromosomalen Bereiche (mit Ausnahme der Zentromer-Bereiche) wird möglich. Die eigentlichen Zentromer-Sequenzen sind in den MCB-Sondenmixen nicht enthalten bzw. werden durch die angewandte CISS-Hybridisierung (Lichter *et al.*, 1988) abgeblockt.

Nach Hybridisierung und Bildbearbeitung ermöglicht die ISIS-Software eine Falschfarb-Zuordnung entlang der Chromosomen abhängig von den Fluorochromkombinationen und den Signalintensitäten. Es wurden sogenannte Standard-Farbklassifikatoren definiert, die die Reproduzierbarkeit der MCB-Muster relativ unabhängig von der Länge der Chromosomen gewährleisten (siehe auch Abb. 3.24). Prinzipiell kann die Falschfarb-Banden-Auflösung, entsprechend des zu analysierenden Falles und der eingesetzten Sonde, durch eine einfache Modifikation der ISIS-Software innerhalb bestimmter Zahlenwerte (methodisch bedingt durch die Software-Version) variiert werden (Liehr *et al.*, 2002). Diese Möglichkeit der Veränderung der Auflösung chromosomaler Banden nur alleine durch eine Software-Applikation ohne zusätzliche präparatorische Maßnahmen der Chromosomen oder weitere Hybridisierungen wurde bisher nur in Zusammenhang mit der MCB-Technik beschrieben.

Die Anzahl der zu erzielenden Farb-Banden ist von der Qualität der regionspezifischen Einzelbanken bzw. deren Hybridisierungseffizienz abhängig und wird auch durch die Qualität der Chromosomenpräparate bestimmt. Im Verlauf der hier durchgeführten Arbeiten war es notwendig, Einzelbanken innerhalb bestimmter MCB-Mixe durch weitere mittels Mikrosezierung hergestellter Banken zu optimieren. In einigen MCB-Mixen traten gleiche Falschfarb-Banden aufgrund identischer Fluorochrom-Profile auf. Durch eine Umstellung des jeweiligen Markierungsschemas konnten solche Probleme größtenteils behoben werden. Eine sichere Unterscheidung der Fluoreszenzsignale der DNA-Sonden in den Einzelbildern ist nur dann gewährleistet, wenn geeignete Fluorochrome und Filter zur Verfügung stehen. Die Fluorochrome Cy5 und Cy5.5 z. B. können aufgrund der relativ dicht beieinander liegenden Emissionsspektren (siehe Abb. 8.1) – besonders bei schwachen Hybridisierungssignalen – zu Durchscheineffekten führen und somit direkt die Qualität der resultierenden Falschfarb-Banden beeinflussen. Durch optimierte Filter, die nur für Licht eines engen Wellenlängenbereiches durchlässig sind oder durch Einsatz von Fluorochromen mit einem anderen Emissionsspektrum, z. B. DEAC, können solche Effekte vermieden werden. Eine Erhöhung der Auflösung nach MCB könnte durch den Einsatz zusätzlicher, durch geeignete Filter unterscheidbarer Fluorochrome erreicht werden, da so Fluorochrom-Profile resultieren, die durch weitere Falschfarben darstellbar sind. Bislang sind allerdings keine weiteren geeigneten Fluorophore erhältlich.

In einigen Hybridisierungen der MCB-Mixe wurde das Phänomen der Überstrahlung von Fluoreszenzsignalen beobachtet (Speicher *et al.*, 1996). Dieses kann - meist in den refusionierten Bereichen der Chromosomen - zu einer irregulären Falschfarb-Bande führen (Chudoba *et al.*, 1999; Weise *et al.*, 2002), da die Falschfarben entsprechend den Fluoreszenzintensitäten zugeordnet werden. Eine sorgfältige Beurteilung der einzelnen Fluorochromprofile ist neben der Beurteilung der Farb-Banden notwendig, um Aussagen über die involvierten chromosomalen Regionen zu treffen und Fehlinterpretationen bezüglich der resultierenden Farb-Bänderung zu vermeiden.

Die mit allen verfügbaren MCB-Mixen erzielbare Auflösung liegt nach Anwendung der Standard-Klassifikatoren zwischen 400 - 800 Banden pro haploiden Karyotyp, so konnte z. B. für Chromosom 20 eine Auflösung von ca. 400 Banden erzielt werden, 550 Banden wurden für Chromosom 5 (Chudoba *et al.*, 1999; Lemke *et al.*, 2001) und 800 Banden für Chromosom 22 nachgewiesen (Liehr *et al.*, 2002).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde in den Fällen mit konstitutionellen Aberrationen eine Auflösung von ca. 450 - 550 Banden pro haploiden Karyotyp erzielt, eine Auflösung, die auch in der Routine-Zytogenetik von Lymphozyten erzielt werden kann. Nach Analyse tumorspezifischer Veränderungen lag die Auflösung zwischen 400 - 550 Banden (Heller *et al.*, *submitted-1*) und war somit deutlich über der nach konventioneller GTG-Färbung erzielbaren Bänderung von Knochenmark-Chromosomen. In den ZOO-FISH-Untersuchungen konnten zwischen 360 - 380 Falschfarb-Banden dargestellt werden (Mrasek *et al.*, 2001, 2003) (siehe auch 4.5). Als Ursache der niedrigeren Auflösung kann die - im Vergleich zur Hybridisierung auf humanen Metaphaseplatten - geringere Hybridisierungseffizienz angesehen werden.

Das Ziel, mittels MCB chromosomale Bruchpunkte auf einem Bandenniveau ≥ 550 Banden pro haploiden Karyotyp zu charakterisieren, konnte nicht in allen untersuchten Aberrationen aufgrund der oben genannten Einschränkungen bezüglich der Qualität der MCB-Sonden, unterschiedlicher Hybridisierungseffizienzen und der methodischen Limitation beim Erstellen der Farbklassifikatoren erreicht werden. Die Beschreibung der Bruchstellen war aber sehr wohl mit einer höheren Genauigkeit möglich, als bei Routine-diagnostischen Untersuchungen erzielt werden kann. Die DNA-spezifische Färbung durch MCB erlaubt eine Charakterisierung chromosomaler Aberrationen, deren Bandenabfolge nach Giemsa-Bänderung nicht oder nur ungenau zugeordnet werden kann (siehe Abb. 1.1 B). Neben der Identifizierung chromosomaler Bruchpunkte ist durch MCB weiterhin eine Beschreibung der Orientierung des/der derivativen Bereiche(s) möglich.

Die MCB-Sondensets können zum einen zur gezielten Analyse einzelner aberrant veränderter Chromosomen eingesetzt werden, oder - wie unlängst von Fr. Weise gezeigt werden konnte - in einem *Multitude-MCB-Mix*, der durch die simultane Hybridisierung aller MCB-Sonden gleichzeitig eine Analyse des gesamten Chromosomensatzes erlaubt (persönliche Mitteilung von A. Weise) (Abb. 8.3, siehe auch 4.6).

4.1.2 Evaluierung der MCB-Methode

Die MCB-Methode wurde durch verschiedene Strategien mittels anderer Techniken der *in-situ* Hybridisierung und/oder durch Einsatz lokusspezifischer Sonden evaluiert. In 10 Fällen mit konstitutionellen und in 5 Fällen mit tumorspezifischen Veränderungen wurden so unterschiedliche Aberrationsmuster vergleichend untersucht, um Aussagen zur Zuverlässigkeit und Auflösung der MCB-Methode zu ermöglichen.

Die zur Evaluierung gewählten Strategien waren zum einen abhängig von der Verfügbarkeit weiterer Methoden oder Sonden zum Zeitpunkt der Analyse, zum anderen natürlich vom Aberrationstyp und den vermuteten Bruchpunkten selber. Im folgenden werden kurz die Anwendungsmöglichkeiten und Auflösungsgrenzen der einzelnen Evaluierungsmethoden erläutert.

M-FISH-Analysen mit wcp-Sonden erlauben Aussagen zum vorliegenden Aberrationstyp, ausgenommen davon sind meist intrachromosomale Rearrangements, wie Inversionen, Deletionen und Duplikationen, und geben einen ersten Überblick über die an einer Aber-

ration beteiligten Chromosomen. Nach M-FISH sind oft keine konkreteren Angaben zu den involvierten Bruchpunkten möglich (Liehr und Claussen, 2002a). Gerade bei komplex veränderten Karyotypen hat es sich insgesamt als günstig herausgestellt, in einem ersten Schritt eine M-FISH-Analyse mit wcp-Sonden durchzuführen (u.a. siehe Fall 26, 27). In tumorzytogenetischen Fällen kann durch eine vorgeschaltete M-FISH zudem eine Aussage zur Klonalität der zu untersuchenden Zellen getroffen werden (siehe Fall 27) (Heller *et al.*, *in press-c*). Aberrationen, die die Zentromer-Region oder die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen betreffen, können mit M-FISH u. U. nicht aufgelöst werden – siehe Fall 21.

In Fall 21 war erst nach einer Mikrosezierung und *Reverse-painting* der entsprechenden DNA-Sonde eine Identifikation der partiell trisom vorliegenden Region im Chromosom 6 möglich (Trifonov *et al.*, 2003). Die Mikrosezierung mit anschließendem *Reverse-painting* erlaubt eine relativ genaue Charakterisierung der in die Aberration involvierten Regionen. Aussagen über die Reihenfolge der chromosomalen Bereiche und deren Orientierung in den derivativen Chromosomen sind hingegen nicht möglich (siehe z. B. Fall 26) (Heller *et al.*, 2003).

Durch eine CGH können Aussagen bezüglich Regionen mit Zugewinnen oder Verlusten chromosomalen Materials getroffen werden, balancierte Umbauten sind nicht nachweisbar. Nach CGH kann der vorliegende Aberrationstyp meist nicht beschrieben werden (Kallioniemi *et al.*, 1993). So war es z. B. im Fall 13 nicht möglich, nach *Micro-CGH* Aussagen über den Insertionspunkt und die Orientierung der duplizierten Region zu treffen. Im Fall 27 konnten nach *Micro-CGH* alle unbalanciert vorliegenden chromosomalen Regionen identifiziert werden. Die Beschreibung der vorliegenden Aberrationen und der involvierten Bruchpunkte war jedoch erst nach MCB möglich (siehe Abb. 3.13). Gerade bei Fällen mit tumorspezifischen Aberrationen können Abweichungen zwischen dem Ergebnis nach CGH und der Analyse von Metaphasechromosomen auftreten, da Interphasekerne und Metaphaseplatten unterschiedliche Proliferationseigenschaften besitzen können (Rooney und Czepulkowski, 1992) und durch CGH ein weiterer – nicht proliferierender – Zellklon erfaßt werden kann. So wurde im Fall 27 mittels *Micro-CGH* der Verlust chromosomalen Materials in 14q21 - q31 detektiert (siehe Abb. 3.13 C), welcher nach GTG, M-FISH und MCB nicht nachweisbar war. Das Vorliegen eines DOP-PCR-Artefaktes ist ebenfalls zu diskutieren, wenngleich verschiedene Autoren in ihren Untersuchungen keine Unterschiede von DOP-amplifizierter zu nichtamplifizierter DNA nachweisen konnten (Harada *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2001).

Durch den Einsatz lokusspezifischer Sonden war es möglich, die MCB-Ergebnisse zu bestätigen (Fall 15, 16, 18, 19, 22), in einigen Fällen konnte eine Präzisierung der Ergebnisse erzielt werden (Fall 14, 17). Im „Idealfall“ ist mittels lokusspezifischer Sonden eine Eingrenzung und Identifizierung chromosomaler Bruchregionen mit Bruchpunktflankierenden oder –überspannenden YAC oder BAC-Sonden möglich (siehe Fall 13 – Abb. 3.8) (Heller *et al.*, 2000a). Gleiche Beobachtungen wurden auch von Weise und Mitarbeitern (2002) beschrieben.

In Abb. 4.1 sind verschiedene molekularzytogenetische Methoden gegenübergestellt bezüglich ihrer Fähigkeit, chromosomale Rearrangements aufzulösen und damit der Möglichkeit, Bruchpunkte exakt zu beschreiben.

Eine weitere denkbare Möglichkeit, die MCB-Methode zu evaluieren, wäre durch den Einsatz der *Matrix-CGH* (Lichter *et al.*, 2000) gegeben. Diese *chip*-Technologie stand zu dem Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeiten allerdings noch nicht zur Verfügung. Zudem erlaubt dieses Verfahren, ähnlich wie die herkömmliche CGH, nur eine Detektion von chromosomalen Imbalancen und läßt keine Aussagen zu den involvierten Bruchpunkten auf zytogenetischer Ebene zu.

4.1.3 Vergleich YAC/BAC-MCB zu MCB basierend auf Mikrosezierungssonden

Für die Chromosomen 2, 13 und 22 war ein MCB-Mix entwickelt worden, der auf lokusspezifischen YAC- und BAC-Sonden basierte (Hybridisierungsbilder des YAC/BAC-MCB für die Chromosomen 2 und 22 bei Liehr *et al.*, 2002a).

Die theoretischen Erwartungen, durch den Einsatz lokusspezifischer Sonden mehr Flexibilität und exaktere Aussagen zu den Bruchpunkten erzielen zu können, wurden nicht erfüllt.

Neben dem Problem, daß die molekulargenetischen Kartierungen in 60 % nicht mit der molekularzytogenetischen Lokalisation der einzelnen YAC-Sonden übereinstimmte (Abb. 3.1 B), war keine komplette Abdeckung der gesamten Chromosomen möglich (Abb. 3.1 D). Dieses kann unter anderem dadurch bedingt sein, daß Bereiche, die repetitive DNA-Sequenzen enthalten, nicht klonierbar sind bzw. durch den Einsatz von COT-1-DNA bei der Hybridisierung abgeblockt werden. Für das ebenfalls getestete Chromosom 22 wurde beschrieben, daß große Abschnitte des Chromosoms evolutiv konservierte *low-copy-DNA-repeats* enthalten (Shaikh *et al.*, 2001), die durch lokusspezifische Sonden nicht markiert werden können.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß eine konzentrationsabhängige Zusammenstellung der lokusspezifischen Sonden in 5 DNA-Pools nicht zu der erwarteten Gaußschen Verteilung der resultierenden Fluorochrom-Profile führte (Abb. 3.1 C). Die Schwankungen der Signalintensitäten der einzelnen Sonden sind unseren Beobachtungen zufolge zu groß, so daß eine Feinabstufung vom Randbereich der DNA-Pools hin zur Mitte nicht erreicht werden kann.

Im Vergleich zu den auf Mikrosezierungssonden basierenden MCB-Mixen sind die YAC/BAC-basierenden MCBs durch weniger und wesentlich inhomogenere Falschfarb-Banden charakterisiert. Die inhomogenen, teilweise „inselartig“ erscheinenden Falschfarben sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß im Vergleich zu Mikrosezierungssonden nur sehr wenige homologe Sequenzen (wenige kb bis ca. 1 Mb) in der als Bande definierten Region hybridisieren.

Die besten Bänderungsergebnisse konnten durch eine Kombination von lokusspezifischen Sonden mit Mikrosezierungssonden erzielt werden, sowohl für Chromosom 13 als auch für das von Fr. Weise etablierte YAC/MCB für Chromosom 2 (Liehr *et al.*, 2002a; Weise *et al.*, 2002).

Die Fluoreszenzprofilkurven und die resultierende Farb-Bänderung für Chromosom 22 war – verglichen mit den YAC/BAC-MCB der Chromosomen 13 und 2 – besser. Eine Ursache dafür könnte die Anzahl der Klone sein, die pro chromosomaler Bande eingesetzt wurden. Auf dem 440 Bandenlevel waren das ~10 Klone pro Bande bei den Chromosomen 13 und 22, aber nur ~4 Klone für Chromosom 2 (Liehr *et al.*, 2002a).

Chromosom 13 ist im Vergleich zu den Chromosomen 2 und 22 vom GTG-Bandenmuster eher „dunkler“. Eine Korrelation zwischen der Qualität des MCB und der Chromatinkondensation, die sich in der Verteilung der Giemsa-hellen und -dunklen Banden auszeichnet (Hliscs *et al.*, 1997a), war bei diesen 3 exemplarisch kreierte Sondenmixen nicht zu beobachten.

Ein YAC-basierender *Chromosome-bar-code* wurde am Beispiel von Chromosom 13 etabliert. Wie gezeigt werden konnte (Abb. 3.5 A), ist dieser Ansatz der Bänderung von Chromosomen nicht geeignet, exakte Bruchpunktanalysen durchzuführen, da keine komplette Abdeckung der Chromosomen erzielt werden kann – im Gegensatz zur MCB-Methode (siehe auch Abb. 4.1).

In der Literatur wurden bisher nur wenige YAC-basierende *Bar-codes* in unterschiedlichen Anwendungen beschrieben. Mit einem *Bar-code-Mix* für Chromosom 12 (Uhrig *et al.*, 1999) erfolgte eine Charakterisierung von Markerchromosomen in klinischen (z. B. Schmidt *et al.*, 2000) und tumorzytogenetischen Fällen (Speicher *et al.*, 2000; Gisselsson *et al.*, 1999).

4.1.4 Derzeit verfügbare FISH-Bänderungsmethoden

Während der Durchführung dieser Arbeit und der Etablierung der MCB-Methode sind eine Vielzahl neuer Ansätze und Möglichkeiten zur FISH-Bänderung von Chromosomen beschrieben worden – siehe Gegenüberstellung der nachfolgend erwähnten Methoden in Tabelle 4.1.

2001 wurde von Aurich-Costa und Mitarbeitern die sogenannte **IPM-FISH** Methode beschrieben. Die Abkürzung IPM steht dabei für IRS-(*interspersed*)-PCR-M-(*multiplex*)-FISH. Menschliche wcp-Sonden wurden dabei mittels IRS-Primern amplifiziert und anschließend durch Nick-Translation mit 5 verschiedenen Fluorochromen markiert. Das resultierende Bandenmuster zeigt ein R-Banden ähnliches M-FISH-Muster. Die Auflösung dieser Bänderungsmethode ist dabei stark von der Chromosomenpräparation und damit der Chromosomenqualität abhängig. Es können ca. 400 Banden pro haploiden Chromosomensatz erreicht werden, eine Charakterisierung kondensierter oder komplex rearrangierter Chromosomen ist sicher nur sehr schwierig möglich.

Unter **Rx-FISH** versteht man eine *Cross-species*-Farb-Bänderung (Müller *et al.*, 1998). Mit Rx-FISH ist eine Auflösung von 80 – 90 Banden pro haploiden Karyotyp möglich, diese Auflösung ist niedriger als bei der konventionellen Chromosomenpräparation von Tumorchromosomen erzielt werden kann.

Eine auf somatischen Zellhybriden basierende Farbbänderung (**somatic cell hybrid based chromosome bar code**) wurde 1997 erstmals von Müller und Mitarbeiter vorgestellt. Mit dieser Methode konnte eine begrenzte Anzahl von Signalen pro Chromosom erzielt werden, die Auflösung liegt bei ca. 100 Banden pro haploiden Chromosomensatz.

Eine **Kombination der somatischen Zellhybrid-Sonden mit dem Rx-FISH Probenset** erfolgte und resultierte in 160 „positiven“ Banden, die einer Auflösung von ca. 400 Banden pro haploiden Karyotyp entsprechen (Müller *et al.*, 2000). So konnte eine spezifischere Anfärbung der chromosomalen Bereiche erzielt werden, wenngleich die Auflösung für einzelne Chromosomen deutlich unter der nach GTG-Bänderung erzielbaren Auflösung liegt.

Eine Farbbänderung der Chromosomen kann weiterhin durch lokusspezifische Sonden (wie z. B. YAC-Sonden) erzielt werden, die in **Chromosome-bar-code**-Sondenmischen zusammengestellt werden (Lengauer *et al.*, 1992, 1993; siehe auch Liehr 2003/homepage –*edb4*). Die Auflösung der Bänderung ist dabei stark abhängig von der Zahl der verwendeten Sonden pro Chromosom und kann ca. 400 Banden pro haploiden Karyotyp betragen.

Eine weitere Bänderungsmethode, die auf dem Einsatz von Mikrosezierungssonden beruht, ist das sogenannte *Spectral-color-banding* (**SCAN**) (Kakazu *et al.*, 2001, 2003). So wurden für die Chromosomen 10 und 3 jeweils 8 bzw. 15 nichtüberlappende Mikrosezierungssonden generiert, die ein Farb-Bandenmuster ähnlich dem Schwarz-Weiß-Muster der GTG-Bänderung erzeugen sollen. Eine Aufspaltung der Farb-Banden in weitere Sub-Banden findet nicht statt, und die Auflösung dieser Bänderungsmethode ist somit limitiert durch die Zahl der pro Chromosom generierten DNA-Banken. Weiterhin ist - aufgrund des Einsatzes von nichtüberlappenden Mikrosezierungssonden - keine vollständige Abdeckung der Chromosomen gegeben, so daß auch nichtmarkierte chromosomale Bereiche resultieren.

Die bisher genannten FISH-Bänderungsmethoden basieren auf unterschiedlichen DNA-Sonden. So wurden sowohl YAC-Sonden (*Chromosome bar code*), regionspezifische Mensch-Hamster-Hybridzellen (*somatic cell hybrid based chromosome bar code*) und nichtüberlappende Mikrosezierungsonden (SCAN) eingesetzt. Mit diesen Sonden kann keine komplette Abdeckung der Chromosomen erzielt werden, die daraus resultierenden Lücken auf den Chromosomen können zu Problemen bei der Bruchpunktcharakterisierung führen; insbesondere dann, wenn die Bruchpunkte innerhalb der unmarkierten Bereiche liegen (Liehr *et al.*, 2002b). Mit der IPM-FISH Technik, dem Rx-FISH und der Kombination der somatischen Zellhybrid-Sonden mit dem Rx-FISH-Probenset hingegen wird eine komplette Abdeckung der einzelnen Chromosomen erzielt und allen chromosomalen Bereichen kann eine bestimmte Farbe zugeordnet werden.

Außer der YAC-basierenden *Chromosome-bar-code*- und der SCAN-Methode sind die hier aufgeführten Probensets für alle menschlichen Chromosomen vollständig verfügbar. Die IPM-FISH-, Rx-FISH- und *Somatic-cell-hybrid-based-chromosome-bar-code*-Sonden-sets markieren simultan alle Chromosomen und erlauben so – ähnlich einer M-FISH-Untersuchung - Aussagen zum gesamten Karyotyp (siehe Tabelle 4.1).

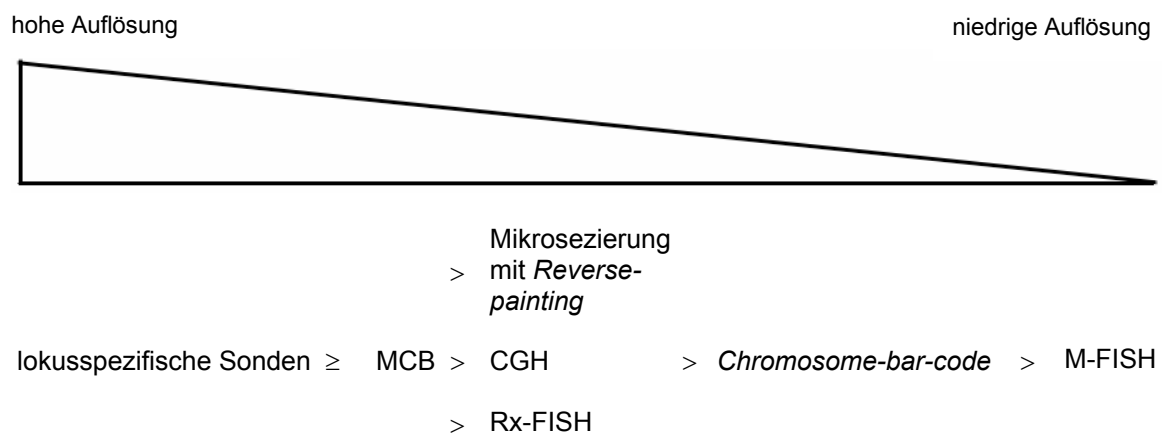


Abb. 4.1

Gegenüberstellung molekularzytogenetischer Methoden und deren Auflösungsvermögen

Tabelle 4.1 Vor- und Nachteile aller bisher beschriebenen FISH-Bänderungsmethoden im Vergleich zu MCB

Bänderungsmethode	eingesetzte Sonden	Verfügbarkeit für alle menschlichen Chromosomen	Simultaner Einsatz für alle Chromosomen	Auflösung (Anzahl der Banden pro haploiden Karyotyp)	Vorteile	Limitationen
IPM-FISH	wcp-Sonden die durch IRS-Primer amplifiziert wurden	vorhanden	wird eingesetzt	~400	lediglich grober Überblick der analysierten MPP möglich	Auflösung ist abhängig von Qualität der Chromosomenpräparation
Rx-FISH	wcp-Sonden von 2 Gibbon-spezies	vorhanden	wird eingesetzt	~80 - 90	lediglich grober Überblick der analysierten MPP möglich	schlechte Auflösung, unempfindliche lokusspezifische Charakterisierung von Aberrationen und Bruchpunkten
<i>Somatic-cell-hybrid-based-chromosome-bar-code</i>	110 somatische Zellhybride Mensch/Hamster	vorhanden	wird eingesetzt	~100	lediglich grober Überblick der analysierten MPP möglich	schlechte Auflösung, nur ungenaue Charakterisierung von Aberrationen und Bruchpunkten, keine komplette Abdeckung der Chromosomen
Kombination der somatischen Zellhybrid-Sonden mit Rx-FISH Proben-set	wcp-Sonden von 2 Gibbon-spezies + 110 somatische Zellhybride Mensch/Hamster	vorhanden	wird eingesetzt	~400	durch Farbänderung kann bessere Auflösung erzielt werden als mit beiden Einzelmethoden	an stark kondensierten Chromosomen ist Auflösung nur bedingt erhältlich
<i>Chromosome-bar-code</i>	Lokusspezifische YAC-Sonden	nicht vorhanden	nicht verfügbar	~400	in Einzelfällen Bruchpunkt-überspannende Sonden identifizierbar	Auflösung abhängig von Anzahl der eingesetzten Sonden, nicht für alle Chr. verfügbar, keine komplette Abdeckung der Chr.
SCAN	Regionspezifische Mikrosequenzierungsbanken	nicht vorhanden	nicht verfügbar	~300	Bänderung ähnlich dem GTG-Bandenmuster	keine Falschfarbdarstellung möglich, keine komplette Abdeckung der Chromosomen
MCB	überlappende regionspezifische Mikrosequenzierungsbanken	vorhanden	ist möglich, ⇒ <i>Multi-tude-MCB</i>	~400 - 800	sensitive Detektion der Aberrationen möglich, gezielte Charakterisierung aberranter Chr.	nicht alle chromosomalen Bereiche können mit der gleichen Auflösung dargestellt werden

4.2 Charakterisierung von Bruchpunkten konstitutioneller und tumor-spezifischer Aberrationen

4.2.1 Bruchpunktpräzisierung bei konstitutionellen Aberrationen

In dem hier untersuchten Kollektiv wurden in 35 % der Fälle die Bruchpunkte, die nach GTG-Bänderung beschrieben wurden, bestätigt. In 65 % der Fälle mußte eine Korrektur der Bruchpunkte vorgenommen werden, wobei in 18 der 30 Fälle erst nach MCB eine Charakterisierung und Bestimmung der chromosomalen Bruchregion möglich war. Auffallend war, daß bei allen untersuchten Duplikations- und Insertions-Fällen eine Bestimmung der Bruchpunkte erst nach MCB erfolgen konnte bzw. eine Korrektur der Bruchpunkte vorgenommen werden mußte.

Weise und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, daß in ca. 80 % der mit MCB für Chromosom 2 untersuchten klinischen Fälle eine Korrektur bzw. Präzisierung der Bruchpunkte und/oder des Aberrationstypes vorgenommen werden mußte. Die Diskrepanz der Zahlen bezüglich der Bruchpunkt-korrektur (65 % in dieser Arbeit, 80 % bei Weise *et al.*, 2002) kann folgendermaßen bedingt sein: (a) es wurden jeweils unterschiedlich viele Fälle untersucht (in dieser Arbeit: 46 Fälle; bei Weise *et al.*, 2002: 11 Fälle) und (b) in dieser Arbeit wurden MCB-Analysen an verschiedenen Chromosomen und einem breiten Spektrum an Aberrationstypen vorgenommen, während in der Arbeit von Weise ausschließlich Aberrationen am Chromosom 2 untersucht wurden. Weiterhin (c) spielt auch die nach GTG-Bänderung erzielte Zahl der Banden pro haploiden Karyotyp eine Rolle. Es war zu erkennen, daß an langen, gut gebänderten Chromosomen die Bruchpunktlokalisationen nach Giemsa-Bänderung und MCB übereinstimmend waren.

Eine Charakterisierung von Bruchpunkten konstitutioneller Aberrationen wurde bisher nur durch M-FISH oder SKY-Analysen mit wcp-Sonden an meist kleineren Fallgruppen durchgeführt. Teilweise erfolgte ein Abgleich dieser Ergebnisse mit weiteren FISH-Sonden, durch Einsatz der *Chromosome-bar-code*-Technik oder CGH (z. B. Schröck *et al.*, 1997; Uhrig *et al.*, 1999; Jalal und Law 1999; siehe auch Liehr, 2003/homepage – *edb4*). Weitere FISH-Bänderungsmethoden, wie *Chromosome-bar-code* und Rx-FISH, wurden bislang nicht in größeren Studien zur Bruchpunktcharakterisierung eingesetzt, Einzelfall-Beschreibungen sind jedoch publiziert (z. B. Schmidt *et al.*, 2000).

Translokationen

Bei den einfach rearrangierten Karyotypen lagen in 16 Fällen Translokationen zwischen 2 Chromosomen als Ursache der Karyotypveränderungen vor. In einer klinisch auffälligen Probandin wurden die Bruchpunkte einer unbalancierten Translokation detektiert (Fall 5), der Vater des Mädchens (Fall 6) war der Träger der balancierten Form der Translokation. In einem weiteren Kasus (Fall 21) konnte eine partielle Trisomie für den kurzen Arm des Chromosoms 6 nachgewiesen werden, Aussagen, ob es sich dabei um ein *de-novo*-Ereignis handelt, können nicht getroffen werden. Erst durch die molekularzytogenetische Untersuchung konnte das derivative Chromosom 13 in seiner Struktur aufgeklärt und die involvierten Bruchpunkte beschrieben werden. Danach war ein Vergleich der klinischen Symptome dieses Patienten zu 3 weiteren beschriebenen ähnlichen Fällen (Giardino *et al.*, 2002) möglich, wobei eine große Übereinstimmung gezeigt werden konnte (Trifonov *et al.*, 2003).

Inversionen

In 16 Fällen wurden jeweils Inversionen bezüglich der involvierten Bruchpunkte analysiert, dabei konnten jeweils 3 familiäre Formen nachgewiesen werden. In dem untersuchten Kollektiv lagen keine so genannten Inversions-„Normvarianten“ (Gardner und Sutherland, 1989) vor.

Komplexe Aberrationen

Die komplex veränderten Fälle waren durch Insertionen (Fall 68 und 69) bzw. Translokationen (Fall 70 und 71) charakterisiert. In Fall 70 wurde im Translokationschromosom t(3;6) nach MCB ferner eine Insertion nachgewiesen und zusätzlich konnten in den aberranten Chromosomen t(3;6) und t(3;15) noch Deletionen der Sub-Telomerregion der Chromosomen 6 und 15 beschrieben werden. In diesen aberranten Karyotyp wurden somit 5 Bruchpunkte identifiziert und beschrieben.

Exakte Bruchpunktanalyse und deren klinische Bedeutung – ein exemplarischer Fall

Wie in Abb. 1.1 schematisch dargestellt, gibt es chromosomale Rearrangements, deren Bruchpunkte nach Giemsa-Bänderung nicht eindeutig beschrieben werden können. Bei einer Patientin (Fall 17) (siehe Abbildung 8.4) wurde im Vorfeld einer intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) eine Chromosomenanalyse durchgeführt. Nach Giemsa-Bänderung der Chromosomen fiel ein strukturell verändertes Chromosom 9 auf. Die Schwarz-Weiß-Bandenabfolge im langen Arm von Chromosom 9 ließ keine sichere Unterscheidung zwischen einer parazentrischen Inversion und einer parazentrischen invertierten Insertion zu (siehe Abb. 8.4 C). In der Literatur wird darauf hingewiesen, daß diese beiden möglichen Aberrationstypen durch verschieden hohe Risiken bezüglich unbalancierter Nachkommen charakterisiert sind. So wurde von Pettenati und Mitarbeitern (1995) bei einer großen Untersuchung von 446 Fällen mit parazentrischen Inversionen das Risiko für Rekombinationen bei den Nachkommen mit 3,8 %, das Risiko beim Vorliegen einer parazentrischen Insertion wurde hingegen mit 15 % angegeben (Madan *et al.*, 1995). Insofern kommt der Charakterisierung der Aberration und der darin involvierten Bruchpunkte sehr große Bedeutung zu, und erst nach MCB-Analyse konnte sicher eine parazentrische Inversion im langen Arm von Chromosom 9 beschrieben werden. In weiteren Hybridisierungen mit lokusspezifischen Sonden konnte zusätzlich noch eine Bruchpunkt-überspannende YAC-Sonde identifiziert werden, die den nach MCB beschriebenen Bruchpunkt in 9q22.2 bestätigt.

4.2.2 Bruchpunktpräzisierung tumorspezifischer Aberrationen

In der hier durchgeführten Studie wurden 52 Knochenmarkproben mit MCB und weiterführenden molekularzytogenetischen Methoden hinsichtlich des Aberrationsprofils und der resultierenden Bruchpunkte untersucht.

In einem Fall erfolgte die Charakterisierung einer Translokation bis auf die Genebene und eine Genfusion konnte nachgewiesen werden.

Dreizehn Fälle mit Neoplasien der myeloischen Zellreihe und einer mittels GTG-Bänderung nachgewiesenen Trisomie für das Chromosom 8 wurden mit der MCB-Sonde für Chromosom 8 untersucht. Das Potential der MCB-Methode zum Nachweis kryptischer Aberrationen sollte überprüft werden.

4.2.2.1 Einfache und komplexe Rearrangements

Bruchpunkte konnten sowohl bei einfachen als auch komplexen Rearrangements in unterschiedlichen Aberrationstypen mittels MCB präzisiert werden.

Die Erfassung des Aberrationsspektrums bestimmter Chromosomen war von besonderem Interesse; deswegen liegt eine Häufung von Fällen mit Aberrationen der Chromosomen 3, 5 und 16 vor.

Durch die MCB-Analysen konnte in ca. 70 % der Fälle eine Korrektur der nach GTG-Bänderung erzielten Bruchpunktbeschreibungen vorgenommen werden. In der Arbeit von Lemke und Mitarbeitern (2001) wurde in 75 % der Fälle mit konstitutionellen und tumorspezifischen Aberrationen eine Bruchpunktkorrektur beschrieben.

Auch an Zellen mit tumorspezifischen Aberrationen wurden bislang keine größeren molekularzytogenetischen Studien zur genaueren Bruchpunktcharakterisierung durchgeführt. Die *Chromosome-bar-code*-Technik wurde in verschiedenen Neoplasien und Zelllinien

eingesetzt (z. B. Gisselsson *et al.*, 2000, 2002; siehe auch Liehr, 2003/homepage – *edb4*), vergleichende Aussagen zu den in dieser Arbeit mittels MCB erhobenen Aussagen sind jedoch nicht möglich.

Durch Rx-FISH-Analysen wurden chromosomale Aberrationen bei hämatologischen Erkrankungen, soliden Tumoren und Zelllinien untersucht (z. B. Teixeira *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2001). Durch Rx-FISH-Analysen können allerdings – bedingt durch eine Bandenauflösung von nur ca. 100 Banden pro haploiden Karyotyp – nur ungenügende Aussagen zu den involvierten Bruchpunkten getroffen werden. Zudem wurde bisher keine umfassende Evaluierung der Daten, z. B. durch den Einsatz von lokusspezifischen Sonden, vorgenommen.

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Knochenmark-Fällen wurden 45 Fälle bezüglich ihrer Bruchpunkte und deren Bedeutung bei hämatologischen Neoplasien publiziert (Heller *et al.*, *submitted*). Dabei wurden bereits bekannte Aberrationen und Bruchpunkte beschrieben. Durch MCB-Analysen konnten weiterhin in 14 Fällen 33 neue, bisher nicht beschriebene chromosomale Bruchpunkte identifiziert werden (siehe Tabelle 8.11 - Anhang). Durch die Beschreibung neuer Bruchpunkte können gezielt weitere Kandidatenregionen untersucht werden, um so Aussagen bezüglich einer Bedeutung für die Tumorprogression bzw. der Rolle im hämatopoetischen System zu erhalten.

Besondere Aspekte der Bruchpunktcharakterisierung werden nun ausführlicher diskutiert:

Aberrationen im Chromosom 5

Interstitielle Deletionen im langen Arm von Chromosom 5 sind die häufigsten strukturellen Rearrangements im myelodysplastischen Syndrom und in akuten myeloischen Leukämien (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology – *edb1*).

In dieser Arbeit wurden in 12 Fällen interstitielle Deletionen im langen Arm von Chromosom 5 nachgewiesen; in 6 Patienten lag zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion ein MDS vor, 5 Patienten zeigten klinisch das Bild einer AML.

Bisherige Daten lassen keine spezifischen Bruchregionen erkennen. In der Literatur werden variable Bruchpunkte zwischen 5q11 und 5q35 beschrieben, eine Häufung der Brüche in 5q12 - 14 und 5q31 - 33 wurde allerdings beobachtet (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology – *edb1*). Mit der MCB-Untersuchung konnte ein breites Spektrum unterschiedlich großer Deletionen nachgewiesen werden. In dem hier vorgestellten Patientenkollektiv war die Region 5q21 - q33 die kleinste mit MCB nachgewiesene Deletion und wurde in einem Fall als alleinige Aberration, sowie in 2 weiteren Fällen bei komplex veränderten Karyotypen, beschrieben. In der Arbeit von Lemke und Mitarbeitern (2001) wurde mittels MCB in einem Patienten mit AML eine Deletion in 5q22 - q32 nachgewiesen. In einer CGH-Studie mit 14 untersuchten Fällen mit einer myeloischen Neoplasie konnte die kleinste deletierte Region auf die Bande 5q31.1 eingegrenzt werden (Gebhart *et al.*, 2000).

In 3 weiteren Suspensionen konnte jeweils der Bruchpunkt, der zu einer terminalen Deletion 5q geführt hat, identifiziert werden. Eine Hybridisierung mit der Sub-Telomer-Sonde für 5q konnte hier aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Zellsuspension nicht durchgeführt werden. Diese 3 Fälle zeichnen sich sowohl bezüglich der Diagnose als auch dem Vorhandensein von zusätzlichen Aberrationen durch Heterogenität aus. In der Literatur sind bisher keine Hinweise zu finden, daß Patienten mit einer terminalen Deletion einer Subgruppe mit anderer klinischer oder prognostischer Relevanz zuzuordnen wären.

Eine komplexe Aberration beider Chromosomen 5 mit einer Deletion in 5q21 - q33 wurde in einer Patientin mit Philadelphia-negativer CML identifiziert (Heller *et al.*, 2002). Bisher konnten Deletionen im langen Arm von Chromosom 5 nur in einigen wenigen Philadelphia-positiven CML-Fällen beschrieben werden (Soligo *et al.*, 1995; Fayad *et al.*, 1997; Zamecnikova *et al.*, 2001). Der hier beschriebene Fall und die Literaturdaten lassen die Vermutung zu, daß auch in einer kleinen Untergruppe von CML-Patienten Deletionen in 5q eine Rolle bezüglich der Pathogenese spielen.

Das breite Spektrum an nachgewiesenen Bruchpunkten bei Deletionen in 5q deutet darauf hin, daß ein Tumorsuppressorgen durch den resultierenden Heterozygotieverlust eine Rolle bei der Pathogenese myeloischer Erkrankungen spielt (Brezinova *et al.*, 2001). Trotz intensiver Suche verschiedener Arbeitsgruppen ist es bisher nicht gelungen, ein verantwortliches Gen zu identifizieren. Boulton und Mitarbeiter (2002) gelang es, Kandidatengene in der ca. 3 Mb großen kritischen Region bei MDS-Patienten zu identifizieren, so sind z. B. die Gene *MEGF1*, ein menschliches Homolog dem Drosophila *fat* Tumorsuppressorgen, und *G3BP* in den Fokus weiterer Forschungen gerückt.

Aberrationen der Chromosomen 3 und 16

Spezifische Aberrationen der Chromosomen 3 und 16, so z. B. *inv(3)(q21q26)*, *t(3;3)(q21;q26)*, *inv(16)(p13;q22)*, *t(16;16)(p13;q22)* (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology –*edb1*) sind als Marker bestimmter Entitäten bei Neoplasien der myeloischen Zellreihe bekannt. So sind Veränderungen im Chromosom 16, die die Bruchpunkte in p13 und q22 betreffen, ein zytogenetisches Äquivalent einer AML M4eo und gehen mit einer hohen kompletten Remissionsrate und einer besseren Prognose verglichen mit anderen Subtypen der AML einher. Eine *inv(16)* ist nach GTG-Bänderung der Chromosomen oft nur schwer zu erkennen, insbesondere dann, wenn schlecht gebänderte und kondensierte Chromosomen vorliegen. Zu Beginn dieser Arbeit standen keine spezifischen Sonden zur Verfügung. Eine Charakterisierung der Aberration und der involvierten Bruchpunkte erfolgte deshalb durch MCB-Analysen. Inzwischen sind kommerzielle, lokusspezifische – den Bruchpunkt des *CBFB*-Gens in 16q22 flankierende – Sonden erhältlich. Diese Sonden erlauben nicht nur eine Beurteilung der Chromosomen 16 in der Metaphaseplatte, sondern ermöglichen auch eine Analyse der Interphasekerne, was besonders für Verlaufskontrollen von Vorteil ist.

Auch im Chromosom 3 sind Regionen bekannt, deren Brüche zu einer *inv(3)* bzw. *t(3;3)* bei AML, MDS bzw. auch bei CML führen können. Bei diesen strukturellen Veränderungen resultiert ein Hybridgen der Gene *RPN1* (3q21) und *EV1* (3q26) (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology –*edb1*). Auch diese Aberrationen korrelieren – in diesem Fall mit einer ungünstigen – Prognose für den Patienten. So beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit nur ca. 4 Monate. Auch eine *inv(3)* ist nicht in jedem Fall sicher nach GTG-Bänderung zu beschreiben. MCB-Analysen erlaubten hingegen einen sicheren Nachweis dieser Aberration. In der Zwischenzeit wurden auch hier lokusspezifische Sonden etabliert, die zudem eine Beurteilung von Interphasekernen ermöglichen sollen (Wieser *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde in 2 Fällen eine *inv(3)*, einmal eine *t(3;3)*, zweimal eine *inv(16)* und in 2 weiteren Fällen eine *t(16;16)* mittels MCB #3 bzw. #16 untersucht. In 6 dieser Fälle konnte die Aberration bereits nach GTG-Bänderung beschrieben werden und eine Bestätigung der Bruchpunkte nach MCB erfolgte. Die *t(3;3)* wurde erst nach MCB detektiert.

Die scheinbare Diskrepanz, daß gerade in diesen Fällen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse nach GTG und MCB – trotz schlechter GTG-Bandenauflösung – vorliegt, kann zumindest für die Aberrationen im Chromosom 16 durch die pathognomonische Bedeutung dieser Aberrationen mit einer AML M4eo erklärt werden, die eine „gerichtete Suche“ während der zytogenetischen Diagnostik bedingt.

Hochkomplex aberrante Fälle

Durch die Multicolor-Bänderung der Chromosomen konnten hochkomplex veränderte Tumor-Karyotypen verschiedener Entitäten untersucht und Aussagen zu den Aberrationstypen und den involvierten Bruchpunkten getroffen werden. Komplex aberrante Karyotypen sind insgesamt mit einer eher ungünstigen Prognose und niedriger Überlebensrate verbunden (Schoch *et al.*, 2001).

4.2.2.2 Molekulargenetische Bruchpunktanalyse einer t(16;21)

Im Fall 48 konnte durch eine molekulargenetische Analyse eine Translokation t(16;21)(p11;q22) und das 5'*FUS*- 3'*ERG* Hybridgen als Produkt der Translokation nachgewiesen werden.

Eine t(16;21) wird häufig bei jungen Erwachsenen beschrieben; zytogenetisch ist diese Translokation nur selten als alleinige Aberration nachweisbar, in den meisten Fällen liegen zusätzliche numerischen oder strukturellen Aberrationen vor (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology –*edb1*).

Auch in dem beschriebenen Fall wurde noch zusätzlich eine unbalancierte Translokation der(4)t(X;4) nach M-FISH identifiziert. Eine Translokation der Chromosomen X und 4 wurden in den bisher veröffentlichten Daten noch nicht beschrieben, und somit sind keine Hinweise zur klinischen Relevanz dieser Aberration zu erhalten.

1994 wurde von Ichikawa und Mitarbeitern gezeigt, daß durch die t(16;21) das *ERG*-Gen mit dem *FUS*-Gen auf Chromosom 16 fusioniert und das chimäre Transkript *FUS-ERG* auf dem derivativen Chromosom 21 nachgewiesen werden kann. Das *ERG*-Gen (*early response gene*) mit dem Genort in 21q22.3 gehört zur ETS-Onkogenfamilie und wirkt als Transkriptionsfaktor. *ERG* wurde als Sequenz-spezifisches DNA-Bindeprotein charakterisiert und ist in myeloischen Vorläuferzellen höher exprimiert als in reifen lymphoiden Zellen. Das Protein wirkt als Regulator auf bestimmte Gene, die für die Erhaltung und/oder Differenzierung früher hämatopoetischer Zellen notwendig sind (OMIM *165080, *edb8*). Das *FUS*-Gen mit dem Genort 16p11.2 besitzt Sequenzhomologien zum *EWS* Onkogen, welches bei Ewing-Sarkomen und anderen Neoplasien rearrangiert ist. Das nukleäre RNA-bindende Protein führt unter anderem zu einer Proliferation der B-Zellen nach mitogenem Stimulus, beeinflusst die Lymphozytenreifung und spielt eine Rolle bei Erhaltung der Genomstabilität (OMIM *137070, *edb8*). Durch eine Fusion zwischen dem *FUS* und *ERG*-Gen wird die RNA-Bindungsdomäne von *FUS* ersetzt durch die DNA-Bindungsdomäne von *ERG* und führt somit zu einer Beeinflussung des Transkriptionsfaktors *ERG*.

Bis dato ist eine t(16;21) in ca. 30 Fällen beschrieben. Auffallend ist, daß diese Aberration bisher nur bei myeloischen Malignomen nachgewiesen werden konnte und zwar in allen Subtypen mit Ausnahme der AML M3 und M6. Ferro und Mitarbeiter publizierten 1992 einen Fall, in welchem eine solche Translokation in einer CML in Blastenkrise auftrat. Zwei weitere Fälle zeigten klinisch ein MDS mit Übergang zu einer AML (Shimizu et al., 1993). In dem hier diskutierten Fall wurde bei dem Patienten eine akute lymphatische Leukämie (c-ALL) ohne Hinweise auf Atypie diagnostiziert.

Die Sequenzanalyse des hier beschriebenen Fusionsgens ergab eine bis dato nicht beschriebene Exonfusion zwischen Exon 7 von *FUS* und Exon 8 von *ERG* (Abb. 3.27). Es kann spekuliert werden, ob die hier gefundene Genfusion eine andere Wirkung ausübt, die letztlich zu einer Tumorprogression einer lymphatischen Zelle führt. Von Li und Mitarbeitern (1999) wurden solche Mechanismen in Mäusen bei dem Fusionsprodukt des *BCR/ABL*-Onkogens nachgewiesen. Die Autoren konnten zeigen, daß unterschiedliche Fusionsprodukte bzw. Splicevarianten von *BCR/ABL* unterschiedliche Leukämiefördernde Eigenschaften in lymphatischen Zellen haben.

Andererseits konnte auch bei den Fällen mit myeloischen Malignomen eine relativ große Heterogenität bezüglich der Fusionsstellen nachgewiesen werden, und bis jetzt liegen noch keine Hinweise vor, daß diese unterschiedlichen hybriden Transkripte zu unterschiedlichen Phänotypen führen (Kong et al., 1997).

Die insgesamt geringe Zahl der bisher beschriebenen Fälle erlaubt noch den Zweifel, ob die beschriebene Fusion überhaupt als ein spezifisch myeloischer Marker einzuordnen ist. Um diese Frage zu beantworten, sollten weitere ALL-Fälle mittels PCR auf das Vorliegen kryptischer *FUS/ERG*-Rearrangements getestet werden.

Nach Vergleich der Sequenzdaten wurde ein durchgehender offener Leserahmen postuliert, allerdings erfolgte im Rahmen dieser Arbeit keine WESTERN-Blot Analyse zur Überprüfung, ob aus dem Fusionsgen ein Protein resultiert.

Die bisher beschriebenen Fälle mit einer t(16;21) gingen mit einer eher ungünstigen Prognose einher. Es konnte in den meisten Fällen keine komplette Remission erzielt werden

(Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology –*edb1*). Von klinischer Seite wird diskutiert, ob Patienten mit einer t(16;21) insgesamt einem anderen Therapieplan unterzogen bzw. frühzeitig bei Erreichen einer Remission transplantiert werden sollten. In dem hier skizzierten Fall wurde eine komplette Remission erreicht.

4.2.2.3 Potentiell kryptische 8er Chromosomenaberrationen

Die Trisomie 8 ist die häufigste numerische chromosomale Aberration in myeloischen Neoplasien (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology –*edb1*) und wird sowohl bei AML, MDS und MPS gefunden. Diese Aberration kann als einzige Veränderung vorliegen, aber auch sekundär bzw. bei komplex rearrangierten Karyotypen nachgewiesen werden.

Während balancierte Rearrangements häufig mit der Bildung von – die Zellproliferation beeinflussenden – Fusionsgenen einhergehen, ist die Auswirkung chromosomaler Zugewinne oder Verluste noch weitgehend ungeklärt. Durch die Erhöhung der Chromosomenzahl könnten Gendosis-Effekte eine Rolle spielen (Beghini *et al.*, 2000) oder spezifische Mutationen bzw. kryptische Fusionsgene im duplizierten Chromosom einen Tumorfördernden Einfluß haben (Diaz *et al.*, 1985, Langabeer *et al.*, 1998).

Eine Analyse mit dem MCB-Sondenset für Chromosom 8 an 13 Fällen mit Trisomie 8 als alleinige Aberration oder in Verbindung mit weiteren zytogenetischen Auffälligkeiten anderer Chromosomen ließ keine kryptischen Aberrationen innerhalb der Chromosomen 8 erkennen (Heller *et al.*, 2003 –*in press-a*). Bei dieser Untersuchung wurde eine MCB-Banden-Auflösung von 20 Banden pro Chromosom 8 erreicht, was einer Giemsa-Banden-Auflösung von ca. 510 Banden pro haploiden Karyotyp entspricht – eine Zahl, die in Chromosomenpräparationen aus Knochenmarkzellen nach GTG-Bänderung nur selten erreicht wird. Trotz der in dieser Studie erreichten hohen Banden-Auflösung für das Chromosom 8 kann das Vorliegen submikroskopischer Mutationen nicht ausgeschlossen werden.

Auch Paulsson und Mitarbeiter (2003) untersuchten AML-, MDS- und MPS-Fälle mit einer Trisomie 8 als einzige Aberration mittels M-FISH (dabei wurde die Technik des *Combined-binary-ratio-labelling* angewandt), pcp-Sonden, Sub-Telomer-Sonden für 8p und 8q und lokusspezifischen Sonden für *c-MYC*, *MOZ*, *FGFR1* und *ETO*. Durch diese Untersuchungen wurden ebenfalls keine kryptischen Aberrationen detektiert.

In dem mit MCB untersuchten Kollektiv wurden in 3 Fällen Zellklone mit Tetrasomie 8 detektiert, die nach GTG-Bänderung nicht nachweisbar waren. Eine Tetrasomie 8 korreliert mit einer schlechten Prognose (Yan *et al.*, 2001).

Die molekularzytogenetischen Ergebnisse dieser Studie und der Arbeit von Paulsson und Mitarbeitern (2003) sowie der Tatsache, daß eine Tetrasomie 8 mit einer schlechteren Prognose einhergeht, erhärtet die Vermutung, daß der tumorfördernde Einfluß durch einen Gendosis-Effekt reguliert wird. Dafür sprechen auch Untersuchungen von Maserati und Mitarbeitern (2002), die zeigen konnten, daß eine Trisomie 8 in MDS- und AML-Patienten in 15 – 20 % der Fälle konstitutionell vorliegt und die Trisomie 8 selbst als erste Mutation bei maligner Transformation betrachtet werden muß.

4.3 Vergleichende Betrachtung der Bruchpunkte konstitutioneller und tumorspezifischer Aberrationen

Nadeau und Taylor stellten 1984 die Hypothese auf, daß die Bruchpunkte genomischer Rearrangements, wie Translokationen und Inversionen, an zufälligen Stellen innerhalb des Genoms liegen.

Um diese These durch Daten dieser Arbeit zu prüfen, wurden alle ermittelten Bruchpunkte, die in den q-Armen der Chromosomen lagen, grafisch dargestellt (siehe Abb. 3.29). Die Bruchpunkte in den kurzen Armen der Chromosomen wurden aufgrund der größeren Längenvariabilität der einzelnen Chromosomen nicht berücksichtigt. Eine Gegenüberstellung der relativen Position der Bruchpunkte in Fällen mit konstitutionellen und tumorspezifischen Aberrationen zeigte eine annähernde Gleichverteilung. Die durch MCB-Analysen identifizierten Bruchpunkte in den Gorilla- und Hylobates-Chromosomen dienten als Referenzwerte und zeigten ebenfalls die erwartete gleichmäßige Verteilung. Eine auffällige Häufung chromosomaler Bruchpunkte der tumorspezifischen Aberrationen bei den Werten 59, 84 und 91 kann dadurch erklärt werden, daß in dieser Arbeit mehrere Fälle mit den gleichen chromosomalen Veränderungen untersucht wurden [z. B. inv(3), inv(16), del(5)] und somit die gleichen Werte ergaben.

Sankoff und Mitarbeiter (2002) verglichen über das Genom verteilte Bruchpunkte von reziproken Translokationen, Inversionen und Deletionen aus Datenbanken von Neoplasien, familiär vorliegenden konstitutionellen und anderen Rearrangements und einem Mensch-Maus vergleichenden Datensatz. Die Autoren konnten 4 Typen der Verteilung erkennen: (I) eine gleichmäßige Verteilung bei familiären Formen von Translokationen und Inversionen und der Mensch-Maus-Homologie Daten, (II) eine telomerassoziierte Verteilung von Translokationen oder Inversionen folgend bei Fehlbildungen von Neugeborenen, (III) eine median geclusterte Verteilung von Translokations- und Inversionsbruchpunkten in Tumorkaryotypen und (IV) eine bimodale Verteilung von Translokations-Bruchpunkten bei Chromosomenarmen, die in Telomernähe Protoonkogene enthalten. Folgende Schlußfolgerungen werden aus diesen Daten gezogen: eine mediane Konzentration von Bruchpunkten in den somatischen Zellen von Tumoren kann bisher nicht erklärt werden, diese somatischen Veränderungen haben aber keine direkte Wirkung auf die Evolution; eine telomerassoziierte Häufung bei Fehlbildungen kann das Resultat abnormer Meiosefiguren sein; während evolutionsbedingt eine gleichmäßige Verteilung von Translokations- und Inversions-Bruchpunkten in phänotypisch unauffälligen Trägern einer Aberration erwartet wird und eine Bestätigung der von Nadeau und Taylor (1984) formulierten Hypothese darstellen. Pevzner und Tesler (2003) postulierten, daß die Genome der Säugetiere Mosaik aus fragilen Stellen mit einer hohen Neigung zur Ausbildung von Rearrangements und stabilen Regionen mit einer niedrigen Aberrationstendenz sind.

Bereits 1988 konnten Koduru und Chaganti zeigen, daß chromosomale Bruchpunkte in Zellen mit konstitutionellen Chromosomenaberrationen gehäuft in Giemsa-negativen Banden auftreten. Sutherland und Simmers (1988) beschrieben auch für Tumorzellen eine Häufung der Bruchpunkte in Giemsa-negativen Banden.

Dies kann wiederum mit der Verteilung der Gene bzw. der Gendichte in den chromosomalen Banden in Zusammenhang gebracht werden. So konnten Musio und Mitarbeiter (2002) in einer Studie von mehr als 5000 kartierten Genen zeigen, daß 81 % dieser Gene in Giemsa-negativen Banden (und diese wiederum entsprechen der Hälfte des Genoms) und nur 19 % in Giemsa-positiven Banden liegen. Die Autoren wiesen nach, daß der Gehalt an Genen direkt korreliert mit der Größe der Bande und der resultierenden Giemsa-Färbung. Allerdings wurden auch zwei genreiche Giemsa-positive Banden (#2p12 und #7q35) identifiziert und eine Heterogenität bezüglich des Gehaltes an Genen innerhalb der Chromosomen wurde beschrieben (Musio *et al.*, 2002).

Die Arbeitsgruppe um Claussen (Hliscs *et al.*, 1997a) konnte zeigen, daß sich beim *Stretching* der Chromosomen nur die Giemsa-positiven Banden in weitere Giemsa-positive und -negative Sub-Banden aufsplitten, während sich aus gedehnten Giemsa-negati-

ven Banden (auf das 400 Bandenstadium bezogen) keine weiteren Sub-Banden ergeben. In weiteren Studien wäre also zu prüfen, ob die kartierten Gene auch wirklich in Giemsa-positiven Banden liegen oder den darin enthaltenen Giemsa-negativen Sub-Banden zuzuordnen sind. Die eigentliche Funktion bzw. Bedeutung Giemsa-positiver Banden im Vergleich zu den Giemsa-negativen Banden konnte bisher nicht geklärt werden. Eine Funktion dieser chromosomalen Sub-Strukturen ist aber wohl anzunehmen, da diese DNA über Millionen von Jahren evolutiven Umbauten widerstanden hat (Musio *et al.*, 2002).

Ein Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten Bruchpunkte bezüglich Giemsa-positiver und –negativer Banden der analysierten Fälle erbrachte folgende Verteilung: (I) in den konstitutionellen Fällen lagen nur 27 % der Bruchpunkte in Giemsa-positiven Banden, 73 % hingegen in Giemsa-negativen Banden. Diese Werte sind übereinstimmend mit den bisher veröffentlichten Daten über Bruchpunktverteilungen. (II) Bei den tumorspezifischen Aberrationen konnte eine annähernde Gleichverteilung der Bruchpunkte festgestellt werden, und (III) auch in den Gorilla- und Hylobates-Chromosomen wurde keine Häufung der – bezogen auf den menschlichen Karyotyp - identifizierten Bruchpunkte in Giemsa-negativen Banden nachgewiesen. Die in dieser Arbeit beurteilten Daten sind im Vergleich zu den größeren Datenbankrecherchen zu gering, um statistisch verwertbare Aussagen zu treffen. Ein weiterer Grund für die zur Literatur widersprüchlichen Daten bezüglich der Bruchpunktverteilung tumorspezifischer Aberrationen besteht in der in dieser Arbeit vorgenommenen Selektion von Fällen. So wurde eine gezielte MCB-Analyse bestimmter Aberrationsmuster in malignen myeloischen Zellen vorgenommen, die keine Aussage über eine generelle Verteilung chromosomaler Bruchpunkte in Tumorzellen erlaubt. Als weiterer beeinflussender Faktor ist die erzielte chromosomale Bandenauflösung zu diskutieren. Je geringer die erzielte Auflösung, um so ungenauer ist auch eine Zuordnung der Bruchregion möglich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Auflösung der Chromosomen von Lymphozyten oder Amnionzellen mit konstitutionellen Aberrationen im allgemeinen auch nach MCB-Analyse etwas höher war (450 - 550 Banden pro haploiden Karyotyp) verglichen zu Tumorchromosomen (400 - 550 Banden).

Auch in den GGO- und HLA-Chromosomen wurden die Bruchpunkte homologer Bereiche nach MCB-Analysen mit humanen Sonden erfaßt und zeigten eine annähernde Gleichverteilung zu Giemsa-positiven und –negativen Banden. Eine Datenbankrecherche (OMIM –*edb8*) der Bruchregionen in den Hylobates-Chromosomen ergab eine Korrelation der Bruchpunktlokalisationen zu „genarmen“ Regionen (siehe auch 4.5.1), und diese sind laut den Untersuchungen von Musio und Mitarbeitern (2002) vorrangig Giemsa-positive Banden. Das wiederum könnte ein Hinweis darauf sein, daß evolutionsbedingte Umbauten nicht nach dem von Koduru und Chaganti (1988) sowie Sutherland und Simmers (1988) beobachteten Phänomen der Bruchpunktverteilung erfolgen.

4.4 Häufige Robertsonsche Translokationen und die Bedeutung konservierter Bruchpunktregionen

Robertsonsche Translokationen werden in der Normalbevölkerung mit einer Häufigkeit von etwa 1:1000 gefunden (Hamerton *et al.*, 1975) und stellen so die häufigste Form struktureller Rearrangements dar.

Frühere Untersuchungen an Robertsonschen Translokationen haben gezeigt, daß bei den häufigen ROB's in den meisten Fällen die Bruchpunkte in der gleichen chromosomalen Region liegen (Han *et al.*, 1994, Page *et al.*, 1996); während die seltenen ROB's sehr variable Bruchregionen aufweisen (Page *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit konnten durch die Untersuchungen mit spezifischen Plasmidsonden die früheren Beobachtungen bestätigt werden, daß die häufigen ROB's [rob(13;14) und rob(14;21)] die Bruchpunkte in der gleichen chromosomalen Region zwischen repetitiven DNA-Klassen aufweisen (siehe Tabelle 8.10). So liegen die Bruchpunkte in den Translokationschromosomen rob(13;14) und rob(14;21) zwischen Sequenzen der Satellit-I-Subfamilie (pTRI-6) und dem Plasmid pTRS-47 (DNA der Satelliten-III-Subfamilie) (Abb. 3.28).

Diese Bruchpunkt-Cluster legen den Verdacht nahe, daß spezifische Mechanismen, eine bestimmte Genomarchitektur oder das Vorhandensein bestimmter Sequenzen die Fusion bestimmter akrozentrischer Chromosomen bedingt (Shaffer und Lupski, 2000).

In ca. 50 % aller Fälle mit ROB's konnte ein *de-novo*-Ereignis nachgewiesen werden (Shaffer *et al.*, 1992). Untersuchungen zur elterlichen Herkunft der häufigen *de-novo* ROB's zeigten, daß die Translokationschromosomen in ~95 % während der mütterlichen Meiose entstehen (Page und Shaffer, 1997). Bandyopadhyay und Mitarbeiter (2002) konnten in 19 der 23 untersuchten Fälle mit rob(13;14) ein maternales Translokationschromosom aufzeigen, zwei paternale Translokationschromosomen konnten identifiziert werden und in zwei Fällen wurde das Translokationschromosom aus mütterlichen und väterlichen Anteilen bestehend nachgewiesen, was wiederum auf ein postzygotisches Ereignis hinweist. Nur ein Fall mit paternaler Vererbung der rob(13;14) zeigte einen abweichenden Bruchpunkt (Bandyopadhyay *et al.*, 2002). Die 31 weiteren untersuchten *de-novo* rob(14;21) waren hingegen alle maternalen Ursprungs und wiesen nach FISH-Analysen alle gleiche Bruchpunktregionen auf.

Als ein möglicher Mechanismus zur Entstehung der häufigen ROB's wird ein Doppelstrangbruch im kurzen Arm der beteiligten Chromosomen diskutiert, der durch die genomische Architektur und/oder bestimmte DNA-Sequenzen erfolgt. Es ist bekannt, daß *Repeat*-reiche Regionen, wie z. B. die Satellit-III-DNA der akrozentrischen Chromosomen, die Ausbildung ungewöhnlicher DNA-Strukturen bedingen können, die wiederum zu einem Arrest der Replikationsgabel führen (Akgun *et al.*, 1997). Das könnte die Ausbildung von Doppelstrangbrüchen initiieren. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kann wiederum zur Ausbildung von chromosomalen Rearrangements, so auch Translokationen, führen (Richardson *et al.*, 1998). Bisher noch nicht bewiesen werden konnte die Hypothese, daß während der Oogenese spezifische Faktoren bestimmte akrozentrische Chromosomen in relative Nähe zueinander bringen und so die Entstehung dieser Translokationen bedingen (Bandyopadhyay *et al.*, 2002). Bestimmte homologe Sequenzen im kurzen Arm von Chromosom 14 konnten in entgegengesetzter Orientierung, verglichen mit den Sequenzen in den Chromosomen 13 und 21, nachgewiesen werden und sind als ein Hinweis auf die Häufung von rob(13;14) und rob(14;21) zu werten (Page *et al.*, 1996). Indirekt könnte der Befund dieser Sequenzhomologie die wenigen Fälle einer rob(13;21) erklären.

Das Vorkommen der variablen Bruchpunkte in den seltenen ROB's könnte das Ergebnis zufälliger Brüche und Austausche repetitiver DNA, so z. B. von Satellit-III-DNA sein, die häufig an verschiedenen Stellen in allen kurzen Armen und perizentrischen Regionen der akrozentrischen Chromosomen vorkommt (Bandyopadhyay *et al.*, 2002). Ein alternativer Mechanismus zur Ausbildung von ROB's könnte durch das Vorliegen von *Short-motifs*

bedingt sein. Bei Bruchpunktanalysen von Translokationen zwischen X-Chromosomen und Autosomen konnten kurze homologe Sequenzen (4 - 6 bp) nachgewiesen werden, die eine Rolle bei der Ausbildung der Translokationen spielten (Bodrug *et al.*, 1987, 1991). Durch eine Analyse verschiedener Unterfamilien von Satellit-III-DNA konnte jeweils ein 5'-GGAAT-3' Monomer analysiert werden (Bandyopadhyay *et al.*, 2001), welches auch in der Bruchpunktregion einer t(X;4) (Giacalone und Francke, 1992) nachgewiesen wurde. Als weitere „hotspots“ für homologe Rekombinationen wurde 1990 von Wahls *et al.* das Vorhandensein von hypervariabler Minisatelliten-DNA diskutiert.

Anzumerken ist, daß Robertsonsche Translokationen als erworbene Aberrationen in hämatologischen Erkrankungen sehr selten beschrieben werden. Die Häufigkeit wird mit 1 in 10000 Tumorpatienten angegeben (Hecht *et al.*, 1988). Das Auftreten dieser seltenen Ereignisse im Rahmen somatischer Mutationen kann als Hinweis gewertet werden, daß ROBs bevorzugt im Rahmen meiotischer Rekombinationsprozesse entstehen.

Eine weiterführende Charakterisierung der Bruchregionen auf molekularzytogenetischer und molekulargenetischer Ebene wird auch in Zukunft von entscheidender Bedeutung für die Identifizierung der Entstehungsmechanismen solcher Aberrationen sein.

4.5 ZOO-FISH-Analysen

Diese Untersuchungen wurden primär zur Evaluierung der MCB-Technik durchgeführt, an dieser Stelle werden die erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse ausführlicher diskutiert.

Bereits in den frühen 60er Jahren wurden erste Studien zur vergleichenden Zytogenetik z. B. an Orangutan- und Gorillachromosomen durchgeführt (Chiarelli, 1961, 1963; Hamerton *et al.*, 1961, 1963). Dabei wurden Ähnlichkeiten der Karyotypen mit denen des Menschen beschrieben. Mit Entwicklung der verschiedenen Bänderungstechniken (R-, G-, Q-, C-Bänderung) wurden zahlreiche vergleichende Untersuchungen durchgeführt und Bandenhomologien zwischen den Chromosomen des Menschen und den „Großen Affen“ beschrieben (Turleau *et al.*, 1972; de Grouchy *et al.*, 1978; Dutrillaux *et al.*, 1973; Lejeune *et al.*, 1973). Bis zum Jahr 1980 erfolgte der Vergleich der Karyotypen der „Großen Affen“ und des Menschen mit ca. 80 weiteren Primatenspezies (Dutrillaux, 1980).

Durch Einsatz der üblichen Bänderungstechniken ist es gerade bei komplexen Umbauten schwierig, eindeutige Homologien innerhalb der Hominoidae nachzuweisen oder genauere Aussagen zu Bruchpunktregionen zu treffen. Aussagen über intrachromosomale Rearrangements, sowie subchromosomale oder bandenspezifische Homologien, waren nur in wenigen Untersuchungen möglich, da die konventionelle Bänderungstechnik nur eine Beurteilung von Helligkeits- und Größenunterschieden der Banden erlaubt.

Mit Einführung der FISH-Technik in den 90iger Jahren wurden ZOO-FISH-Studien etabliert. Mammalia-Spezies können so durch Verwendung von spezifischen humanen Chromosomen-Sonden analysiert werden (Zusammenfassung bei O'Brien *et al.*, 1999). Durch Einsatz humaner wcp-Sonden konnten zum Menschen homologe Regionen auf Gorilla- und Hylobates-Chromosomen nachgewiesen werden (Jauch *et al.*, 1992). Intrachromosomale Rearrangements – die vorherrschenden Mechanismen, durch welche sich die höheren Primatenchromosomen unterscheiden – entgehen diesen Analysen weitgehend. In neueren Untersuchungen wurden daher zunehmend region- oder lokus-spezifische Sonden (Chromosomenarm-spezifische Sonden und c-DNAs) eingesetzt (Stanyon *et al.*, 1992, Koehler *et al.*, 1995). Eine genom-umfassende Analyse mit lokus-spezifischen Sonden ist allerdings nur schwer realisierbar.

4.5.1 *Gorilla gorilla*

Mit Hilfe der 25M-FISH Technik war es möglich, sich einen Überblick über den Karyotyp der Spezies zu verschaffen und die Verteilung des Heterochromatins zu erfassen (Mrasek *et al.*, 2001).

Für das MCB-Probenaset unter Einsatz der 22 humanen Autosomen und des X-Chromosoms wurde ein Bandenlevel von 383 Banden pro haploiden Chromosomensatz gewählt. Diese Auflösung ermöglichte eine reproduzierbare Falschfarb-Bänderung der GGO-Chromosomen im Vergleich zu HSA-Chromosomen.

Die meisten Resultate der angeschlossenen MCB-Studien sind mit den bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnissen übereinstimmend. Die Bruchpunkte der perizentrischen Inversion in GGO-Chromosom 3 wurden aufgrund der MCB-Bänderung um je eine GTG-positive Bande korrigiert - verglichen mit den Daten von Yunis und Prakash (1982). Im GGO-Chromosom 14 konnte nach MCB keine parazentrische Inversion beschrieben werden, entgegen der Veröffentlichung von Müller *et al.* (1997) und Wienberg und Stanyon (1997). Eine Hybridisierung mit regionspezifischen YAC-Contigs für HSA #13 in der fraglichen chromosomalen Region bestätigte das durch MCB erhaltene Ergebnis. Eine perizentrische Inversion in GGO-Chromosom 16 (Yunis und Prakash, 1982; Müller *et al.*, 1997) war ebenfalls nach Analyse der Falschfarben nicht sichtbar. Auch dieses MCB-Ergebnis wurde durch weitere Hybridisierungen mit spezifischen Mikrosezierungssonden bestätigt. Die in GGO #19 beschriebene 24 kb umfassende Mikroduplikation (Stankiewicz *et al.*, 2001) konnte mit der MCB-Analyse aufgrund ihrer geringen Größe nicht identifiziert werden.

4.5.2 *Hylobates lar*

Im Vergleich zu den humanen Chromosomen weisen die Gibbons massive Reorganisationen auf. Im Karyotyp von *Hylobates lar* finden sich nur meta- oder submetazentrische Chromosomen, akrozentrische Chromosomen hingegen sind nicht vorhanden (Chiarelli, 1963; Hamerton *et al.*, 1963). Gibbons gehören, wie die „Großen Affen“ und *Homo sapiens*, zur Superfamilie der Hominoidea, unterscheiden sich von den anderen Primaten aber durch eine sehr viel höhere Rate von chromosomalen Rearrangements (Nie *et al.*, 2001).

Eine Karyotypisierung der HLA-Chromosomen nach 25M-FISH war sehr schwierig, da komplexe Translokationsgeschehen vorlagen (Mrasek *et al.*, 2003). Kleinere homologe Regionen konnten durch den Einsatz der wcp-Sonden nicht immer identifiziert werden, so war z. B. die Homologie im terminalen Bereich des langen Arms von HLA-Chromosom 15 zu HSA #21 nicht sichtbar. Auch in den HLA #14 und 16 konnten kleinere Bereiche nicht exakt zugeordnet werden.

Für die MCB-Auswertung der HLA-Chromosomen wurde eine Auflösung von 364 Banden pro haploiden Chromosomensatz gewählt und so konnte ein reproduzierbares Falschfarb-Muster erzielt werden.

Jauch *et al.* (1992) zeigten, daß die humanen Chromosomen 11, 14, 20, X und Y ohne interchromosomale Rearrangements homolog sind zu den HLA-Chromosomen 11, 17, 21, X und Y. Nach Analyse von MCB #11 wurden jedoch zusätzlich Signale auf HLA #5 detektiert. Weiterhin wurde im HLA #17 eine bisher nicht beschriebene parazentrische Inversion nachgewiesen. Es konnte außerdem festgestellt werden, daß HLA #12 homologe Regionen von HSA #2 und #3 sowie #8 enthält.

Bei fast allen HLA-Chromosomen (mit Ausnahme von #21, X und Y) konnten nach MCB Inversionen beschrieben werden.

Von Tantravahi *et al.* (1975) wurden anhand der G-Bänderung Ähnlichkeiten zwischen HLA #2q und HSA #3q, zwischen HLA #3 und HSA #13 und 14 und zwischen HLA #12p und HSA #11p beschrieben, die aber nach MCB-Analyse nicht bestätigt werden konnten.

Durch die MCB-Bänderung war es zudem möglich, Aussagen zur Zentromer-Position in den HLA-Chromosomen zu treffen. In 14 von 23 (61 %) Chromosomen lagen die Zentromere konserviert an entsprechender Stelle wie im HSA-Chromosom vor. Neo-Zentromer-

Formationen wurden in 6 von 23 (26 %) Chromosomen jeweils an der Fusionsstelle zweier Chromosomen identifiziert, während in 3 Chromosomen (13 %) komplett neue Positionen beschrieben werden konnten. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Montefalcone und Mitarbeitern (1999), die zeigen konnten, daß Zentromer-Sequenzen einer anderen Evolutionsgeschwindigkeit unterliegen als andere Bereiche des Genoms. Verglichen mit dem humanen Karyotyp konnten in den HLA-Chromosomen 72 Bruchpunkte identifiziert werden. Die Bruchregionen wurden mit den Daten aus der Literatur (OMIM - *edb8*) verglichen (Mrasek *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, daß 43 von 72 (60 %) der Bruchpunkte in chromosomalen Regionen liegen, die weniger als 15 Gene beinhalten. 26 von diesen 43 verglichenen Bruchpunkten (60 %) enthielten dabei jeweils weniger als 5 Gene. Nur 5 Regionen wurden in den verbleibenden 27 Bruchregionen (mit > 15 Genen) identifiziert, in denen 26 bis > 100 Gene enthalten waren. Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die Mehrzahl der erfolgten Rearrangements bei HLA in „Gen-armen“ Regionen stattgefunden haben.

Allgemeine Betrachtungen

Mit den hier dargestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die MCB-Technik auch geeignet ist, chromosomale Bruchpunktanalysen in ZOO-FISH-Experimenten durchzuführen.

Die Zelllinien der GGO- und HLA-Spezies wiederum eigneten sich gut zur Evaluierung der MCB-Methode, da bereits die Mehrzahl der chromosomalen Umbauten und entsprechenden homologen Bereiche beschrieben sind und somit ein Vergleich der nach MCB erhaltenen Daten erfolgen konnte.

Der Vorteil des MCB im Vergleich zur Beurteilung der GTG-Bänderung beruht in der oben schon erwähnten Zuordnung charakteristischer und reproduzierbarer Falschfarben, die wiederum Aussagen zur den chromosomalen Regionen erlauben. So war möglich, homologe Bereiche durch den Vergleich der Falschfarb-Banden und Fluorochromprofile der einzelnen humanen Chromosomen mit der Bänderung auf den GGO- bzw. HLA-Chromosomen zu identifizieren und zu beurteilen. Auch hier zeigten sich die Vorteile der überlappenden Mikrosezierungsbanken, die eine vollständige Abdeckung des gesamten Genoms gewährleisten. Somit war es bei den hier vorgestellten ZOO-FISH-Untersuchungen erstmals möglich, alle regionspezifischen nichtrepetitiven humanen Sequenzen vollständig auf den GGO- und HLA-Chromosomen zu hybridisieren und Aussagen bezüglich der Homologien der Genome auf einem bisher nicht erreichten Bandenniveau von 360 - 380 Banden pro haploiden Karyotyp zu treffen (Mrasek *et al.*, 2001, 2003).

Bisherige Veröffentlichungen zur vergleichenden Genomanalyse beruhten auf den klassischen Bänderungsverfahren bzw. dem *Bar-code*. Eine Anwendung des *Chromosome-bar-codes* bei den „Großen Affen“ zeigte eine ähnliche Hybridisierungseffizienz wie bei HSA, bei den „Niederer Affen“ fiel diese aber wegen unspezifischen Hybridisierungen aufgrund großer Sequenzunterschiede deutlich geringer aus (Müller *et al.*, 1997; Müller und Wienberg, 2001). Auch in den MCB-Analysen wurden in den GGO- und besonders in den HLA-Chromosomen schwächere Hybridisierungssignale im Vergleich zu menschlichen Chromosomen festgestellt. Um eine adäquate Beurteilung der Farb-Banden zu ermöglichen, wurden vor dem Pepsinverdau eine RNase-Behandlung durchgeführt und die DNA-Sonden doppelt konzentriert zur Hybridisierung eingesetzt.

Die am häufigsten vorkommenden Rearrangements innerhalb der Karyotypevolution von „Großen Affen“ zu *Homo sapiens* sind Inversionen, dagegen findet man Translokationen, Robertsonsche Fusionen und „Chromosomensplitting“ (eine Aufteilung chromosomaler Regionen auf mehrere Chromosomen) häufig bei den „Niederer Affen“ und den niederen Primaten.

4.6 Mechanismen zur Entstehung chromosomaler Rearrangements

Chromosomale Rearrangements entstehen nach Rekombination genomischer Sequenzen. Bei der Entstehung konstitutioneller chromosomaler Rearrangements scheinen 3 Schritte abzulaufen: (I) ein DNA-Doppelstrangbruch als Auslöser des Prozesses, (II) eine Wechselwirkung der Sequenzen, die rekombinieren und (III) die Lösung der rekombinierenden Sequenzen mit der Bildung neuer rekombinanter Produkte (Shaffer und Lupski, 2000).

Die Bruchpunkte der häufigen chromosomalen Aberrationen sind mit bestimmten genomischen Strukturen, wie *Low-copy-repeats* (LCRs) oder AT-reichen Palindromen assoziiert, die zur nichtallelischen homologen Rekombination führen können. Mögliche Mechanismen der Entstehung Robertsonscher Translokationen wurden unter Punkt 4.4 diskutiert.

Regionspezifische LCRs bestehen aus DNA-Blöcken von 10 - 400 kb, die zu 97 % identisch sind und können Gene, Genfragmente, Pseudogene und endogene retrovirale Sequenzen enthalten (Stankiewicz und Lupski, 2002). Es konnte nachgewiesen werden, daß die Länge der LCRs die Rekombination beeinflussen und längere LCRs zu größeren rearrangierten chromosomalen Fragmenten führen (Lupski, 1998).

Ungleiches *Crossing-over* zwischen gleich orientierten LCRs auf homologen Chromosomen kann zu zwei reziproken Produkten führen: einer direkten Duplikation, wie es z. B. für die Region 17p12 bei Charcot-Marie-Tooth Typ 1A beschrieben wurde (Pentao *et al.*, 1992) oder einer Deletion (Chance *et al.*, 1994). Eine Fehlpaarung invertierter LCRs auf homologen Chromosomen kann hingegen zu einer Inversion führen (Stankiewicz und Lupski, 2002). Es wurde weiterhin gezeigt, daß auch die Bruchpunkte von SMCs der Chromosomen 15 und 22 innerhalb von LCRs liegen (Ungaro *et al.*, 2001; McTaggart *et al.*, 1998).

Palindromische, AT-reiche Sequenzen in 11q23 und 22q11 können durch nichthomologe Rekombination zur Ausbildung von Haarnadel-Strukturen führen, die wiederum die Entstehung der häufigen reziproken Translokation t(11;22)(q23;q11) beeinflussen können (Edelmann *et al.*, 2001).

Stankiewicz und Mitarbeiter (2003) konnten auch in Fällen mit seltenen Deletionen und verschiedenen Translokationen unter Beteiligung des kurzen Arms von Chromosom 17 LCRs als die genomischen Strukturen identifizieren, die zu Fehlpaarungen bei Rekombination führen können.

Auch bei somatischen chromosomalen Mutationen wurden LCRs in den Bruchpunkt-flankierenden Regionen nachgewiesen, so beim Isochromosom 17q (Scheurlen *et al.*, 1999), und auch bei der Philadelphiachromosom-Translokation t(9;22) wurde kürzlich ein 76 kb großes LCR identifiziert (Saglio *et al.*, 2002).

Gerade nach Veröffentlichung der Sequenzen des humanen Genomprojektes [International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC) 2001; Venter *et al.*, 2001] sind vielfältige Daten verfügbar, die die Identifikation weiterer LCRs bzw. LCR-ähnlicher Strukturen erlauben, um dadurch spezifischere Aussagen über den Einfluß der genomischen Architektur der Bruchregionen bei chromosomalen Aberrationen zu ermöglichen.

4.7 Ausblicke

Aussagen zur Bruchpunktlokalisation chromosomaler Aberrationen sind mittels DNA-basierender Bänderungsverfahren möglich. Die Methode des MCB erlaubt eine Beschreibung derivativer Chromosomen und der darin involvierten Banden und Sub-Banden relativ unabhängig vom Kondensationszustand der Chromosomen.

Das bereits unter Punkt 4.1.2 erwähnte Verfahren des *Multitude*-MCBs wird in Zukunft sicher an Bedeutung gewinnen und sich zu einer fest etablierten Methode entwickeln (Abb. 8.4). So wird es möglich, bei Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer konstitutionellen Aberration und einem unauffälligen Karyotyp eine „Feinanalyse“ der Chromo-

somen vorzunehmen, wobei alle Chromosomen nach nur einer Hybridisierung beurteilt werden können. Eine hochauflösende Beurteilung aller Chromosomen durch nur einen Hybridisierungsansatz ist vorallem in den Fällen bedeutsam, in welchen nur wenige Metaphaseplatten einer Analyse zur Verfügung stehen, wie es häufig in tumorzytogenetischen Fällen und Fruchtwassersuspensionen der Fall ist.

Der *Multitude*—MCB-Sondenmix wurde von A. Weise schon in verschiedenen Fällen mit konstitutionellen und tumorspezifischen Aberrationen eingesetzt. Das Verfahren des *Multitude*-MCB ist auch für Analysen von Zelllinien geeignet (Weise *et al.*, *in preparation*).

Multicolor-Bänderungsmethoden sind nach wie vor durch die Verfügbarkeit geeigneter, klar von einander unterscheidbarer Fluorochrome limitiert. Die Methode des *Ratio-labelings* (Tanke *et al.*, 1999) ermöglicht zwar eine farbliche Differenzierung der DNA-Sonden, diese führt aber methodisch bedingt nicht zu einer Erhöhung der Multicolor-Banden. Auch in Zusammenhang mit dem *Multitude*-MCB ist es daher nach wie vor von Interesse, neue Fluorochrome miteinzubeziehen. Wenn neue Fluorochrome verfügbar wären, könnten die Aufnahmen durch Mikroskope mit einem 8 - 10 Positionen umfassenden Filterblock realisiert werden.

Lemke und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, daß eine MCB-Analyse der Chromosomen auch in Interphasekernen mit einer der Metaphasechromosomen vergleichbaren Auflösung möglich ist. Dadurch wird es möglich, sich-nicht-teilende Zellen zu analysieren.

Weitere Untersuchungen hierzu wären mit einem Laser-Scanning-Mikroskop zur 3-dimensionalen Darstellung denkbar. So können die im herkömmlichen Lichtmikroskop auftretenden Überlagerungen ausgeglichen werden, und die Zahl der auswertbaren Kerne nimmt zu.

Unter Erhalt der 3-Dimensionalität (Steinhäuser *et al.*, 2002) wird es weiterhin möglich, Untersuchungen zur räumlichen Anordnung von chromosomalen Strukturen im Hinblick auf Entstehungsmechanismen chromosomaler Aberrationen durchzuführen.

Weitere Bedeutung bei der Identifikation chromosomaler Rearrangements im Hinblick auf klinische Auffälligkeiten bzw. Konsequenzen wird sicher der am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, von H. Starke entwickelten Methode des Sub-Zentromer-FISH zukommen (Starke *et al.*, *-in press*). Bisher wurde diese Technik, die eine Aussage zu zentromernahen Bereichen in den Chromosomen liefert, vorwiegend bei der Charakterisierung kleiner überzähliger Markerchromosomen angewandt. Eine klinische Korrelation zu kleinen partiellen Trisomien zentromernaher Bereiche konnten in konstitutionell aberranten Fällen nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Dr. T. Liehr). Fraglich bleibt, ob solche kryptischen partiellen Trisomien auch in tumorzytogenetischen Fällen nachweisbar sind und wenn ja, ob eine Bedeutung für die Tumorprogression bzw. den klinischen Verlauf ableitbar ist.

Die Untersuchungen dieser Arbeit und die verfügbaren Literaturdaten bringen zum Ausdruck, daß Bruchpunkte auf zyto- bzw. molekularzytogenetischer Ebene als scheinbar homogene Ereignisse betrachtet werden.

Auf molekulargenetischer Ebene liegen bisher nur Einzeluntersuchungen vor, primär Onkogene betreffend, in denen eine Subdifferenzierung der Bruchregionen vorgenommen wurde. So weiß man zwar, daß z. B. im *BCR*-Gen verschiedene Bruchpunktcluster existieren, Aussagen darüber, welche Faktoren oder Ereignisse schließlich den Doppelstrangbruch initiieren und in welcher Weise ein solcher Bruch die chromosomale Struktur beeinflußt, sind nicht bekannt.

Eine exaktere Beschreibung der Bruchpunktlokalisation auf chromosomaler Ebene, wie in dieser Arbeit durchgeführt, kann hilfreich sein und als Ausgangspunkt dienen, um weitere Untersuchungen und Sub-Differenzierungen vorzunehmen, die dem Verständnis der Entstehung chromosomaler Aberrationen dienen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, mittels molekularzytogenetischer und molekulargenetischer Ansätze chromosomale Bruchpunkte, genauer als bisher möglich, zu charakterisieren.

Dazu war es notwendig, ein DNA-basierendes Bänderungsverfahren für alle humanen Chromosomen zu entwickeln, welches eine Beschreibung chromosomaler Bruchpunkte auf Sub-Bandenlevel ermöglicht. Diese als Multicolor-Bänderung bezeichnete Methode wurde durch regionspezifische und überlappende Mikrosezierungsbanken realisiert. Die resultierenden Fluoreszenzintensitätsprofile können mittels Computer in Falschfarben übersetzt werden; die resultierende Farb-Bänderung ist in hohem Maße reproduzierbar und relativ unabhängig vom Kondensationszustand der Chromosomen. Die durch MCB erzielbare Auflösung lag bei 450 - 550 Banden pro haploiden Karyotyp, für einzelne Chromosomen konnten deutlich höheren Auflösungen erzielt werden.

Eine Weiterentwicklung sollte die Etablierung eines auf lokusspezifischen Sonden basierenden YAC-MCBs sein. Am Chromosom 13 wurde gezeigt, daß eine Kombination von YAC- und Mikrosezierungssonden zwar möglich war, sich aber zur Bruchpunktcharakterisierung schlechter eignete als das auf Mikrosezierungssonden basierende MCB.

Eine Evaluierung der MCB-Methode, um die Eignung zur Bruchpunktcharakterisierung zu überprüfen, wurde anhand verschiedener Aberrationstypen durch den Einsatz weiterer molekularzytogenetischer Methoden und lokusspezifischer Sonden vorgenommen. Es konnten durch die angewandten Verfahren jeweils gute Übereinstimmungen bei der Beschreibung chromosomaler Bruchregionen erzielt werden, z. T. war eine Präzisierung des Ergebnisses erst nach MCB möglich. Im Rahmen der Evaluierung wurden auch ZOO-FISH-Analysen an *Gorilla gorilla*- (niedrig aberrant) und *Hylobates lar*-Zelllinien (hoch aberrant) durchgeführt. Durch die Hybridisierung der menschlichen MCB-Sonden konnte über das gesamte Genom eine Beurteilung aller homologen Bereiche und der involvierten Bruchregionen erfolgen.

Mittels MCB wurden anschließend konstitutionelle (46 Fälle) und tumorspezifische (52 Fälle) Aberrationen untersucht und deren Bruchpunkte charakterisiert.

In 35 % der Fälle mit konstitutionellen Veränderungen konnte der nach GTG-Bänderung beschriebene Befund bestätigt werden, in 26 % erfolgte eine Korrektur der Bruchpunkte und in weiteren 39 % der analysierten Fälle war erst nach MCB eine Charakterisierung der Aberration(en) möglich. Eine exakte Bruchpunktdefinition erlaubte in 14 von 46 Fällen eine Genotyp/Phänotyp-Korrelation bzw. lieferte den Hinweis auf eine Kandidatengregion.

Bei den tumorspezifischen Aberrationen wurde in 31 % der Fälle der nach Giemsa-Bänderung beschriebene Karyotyp bestätigt, in 33 % mußte eine Korrektur der Bruchpunkte vorgenommen werden und in 36 % der Fälle war erst nach MCB eine Beschreibung der Aberration(en) möglich. Es konnten Bruchpunkte bestätigt oder charakterisiert werden, die bereits in Zusammenhang mit malignen hämatologischen Erkrankungen beschrieben wurden. Zudem war es möglich, 33 weitere, bisher unbekannte, Bruchpunkte zu identifizieren, deren Bedeutung bei Leukämien noch nicht bekannt ist.

Zum Nachweis möglicher kryptischer Aberrationen wurden Trisomie-8-Fälle mit myeloidischen Neoplasien mittels MCB-Verfahren untersucht. Trotz einer erzielten Auflösung von ca. 510 Banden pro haploiden Karyotyp konnten keine Abweichungen innerhalb der Chromosomen 8 identifiziert werden. Möglicherweise wird die Zellproliferation dieser malignen Zellen durch einen Gendosiseffekt der Chromosomen 8 bewirkt und ist nicht auf eine molekularzytogenetisch sichtbare Veränderung einzelner Gene oder Genabschnitte zurückzuführen.

Kleinere Deletionen bzw. telomernahe Rearrangements konnten durch das MCB-Verfahren nicht in jedem Fall sicher nachgewiesen werden. Mit der MCB-Methode ist es ebenfalls nicht möglich, Aberrationen in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen zu beschreiben. In dieser Arbeit wurden die Bruchpunkte der häufigen Robertsonschen Translokationen mittels lokusspezifischer Plasmidsonden erfaßt.

6 Literaturverzeichnis

- Akgun E**, Zahn J, Baumes S, Brown G, Liang F, Romanieko PJ, Lewis S, Jasin M (1997) Palindrome resolution and recombination in the mammalian germ line. *Mol Cell Biol* 17: 5559-5570
- Archidiacono N**, Antonacci R, Marzella R, Finelli P, Lonoce A, Rocchi M (1995) Comparative mapping of human alloid sequences in great apes using fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 25: 477-484
- Arnold J** (1879) Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Virchows Arch Path Anat* 77: 181-206
- Arnoldus EP**, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der Ploeg M, Raap AK (1990) Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet Cell Genet* 54: 108-111
- Arrighi FE** und **Hsu TC** (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-6
- Aurich-Costa J**, Vannier A, Gregoire E, Nowak F, Cherif D (2001) IPM-FISH, a new M-FISH approach using IRS-PCR painting probes: application to the analysis of seven human prostate cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 143-1460
- Avery OT**, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 79: 137-158
- Bandyopadhyay R**, McQuillan C, Page SL, Choo KHA, Shaffer LG (2001) Identification and characterization of satellite III subfamilies to the acrocentric chromosomes. *Chromosomes Res* 9: 223-233
- Bandyopadhyay R**, Heller A, Knox-DuBois C, McCaskill C, Berend SA, Page SL, Shaffer LG (2002) Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet* 71: 1456-1462
- Batley J**, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G, Leder P (1983) The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34: 779-787
- Beghini A**, Ripamonti CB, Castorina P, Pezzetti L, Doneda L, Cairoli R, Morra E, Larizza L (2000) Trisomy 4 leading to duplication of a mutated KIT allele in acute myeloid leukemia with mast cell involvement. *Cancer Genet Cytogenet* 119: 26-31
- Blackburn EH** und **Greider CW**, eds. (1995) Telomeres. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Bloom SE** und **Goodpasture C** (1976) An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet* 34: 199-206
- Bodrug SE**, Ray PN, Gonzalez IL, Schmickel RD, Sylvester JE, Worton RG (1987) Molecular analysis of a constitutional X-autosome translocation in a female with muscular dystrophy. *Science* 237: 1620-1624
- Bodrug SE**, Holden JJ, Ray PN, Worton RG (1991) Molecular analysis of X-autosome translocations in females with Duchenne muscular dystrophy. *EMBO J* 10: 3931-3939
- Bohlander SK**, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Rowley JD, Diaz MO (1992) A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. *Genomics* 13: 1322-1324

- Boultonwood J**, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Gama S, Kearney L, Tosi S, Kasprzyk A, Cheng JF, Jaju RJ, Wainscoat JS (2002) Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 99: 4638-4641
- Boveri T (1903)** Über die Konstitution der chromatischen Kernsubstanz. In: Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 13. Jahresversammlung zu Würzburg. Korschelt E, Hrsg. Leipzig: Wilhelm Engelmann. S. 10-33
- Brezinova J**, Zemanova Z, Michalova K (2001) [Deletion of the long arm of chromosome 5 in patients with hematologic malignancies]. *Cas Lek Cesk* 140: 44-46
- Buongiorno-Nardelli M und Amaldi F (1969)** Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. *Nature* 225: 946-947
- Burke DT**, Carle GF, Olson MV (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 15: 806-812
- Buselmaier W und Tariverdian G (1999)** Humangenetik. 2. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Caspersson T**, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49: 219-222
- Caspersson T**, Zech L, Johansson C (1970a) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319
- Caspersson T**, Zech L, Johansson C (1970b) Analysis of human metaphase chromosomes set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res* 62: 490-492
- Chance PF**, Abbas N, Lensch MW, Pentao L, Roa BB, Patel PI, Lupski JR (1994) Two autosomal dominant neuropathies result from reciprocal DNA duplication/deletion of a region on chromosome 17. *Hum Mol Genet* 3: 223-228
- Chiarelli B (1961)** Chromosomes of the orang-utan (*Pongo pygmaeus*). *Nature*, lond. 192: 285
- Chiarelli B (1963)** Comparative morphometrics analysis of primata chromosomes. III. The chromosomes of the genera *Hylobates*, *Colobus* and *Presbytis*. *Caryologia* 16: 637-348
- Choo KH**, Earle E, McQuillan C (1990) A homologous subfamily of satellite III DNA on human chromosomes 14 and 22. *Nucleic Acid Res* 11: 5641-5648
- Choo KH**, Earle E, Vissel B, Kalitsis P (1992) A chromosome 14-specific human satellite III DNA subfamily that shows variable presence on different chromosomes 14. *Am J Hum Genet* 50: 706-716
- Chudoba I**, Henn TK, Senger G, Claussen U (1997) Comparative genomic hybridization using DOP-PCR amplified DNA from small number of nuclei. *Cs Pediat* 52: 519-521
- Chudoba I**, Plesch A, Lörch T, Claussen U, Senger G (1998) Multi-color-banding for the identification of interstitial deletion of chromosome 5. *medgen* 10: 116 (abstract)
- Chudoba I**, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G (1999) High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84: 156-160
- Chung MY**, Lu JH, Chien HP, Hwang B (2001) Chromosome 22q11 microdeletion in conotruncal heart defects: clinical presentation, parental origin and de novo mutations. *Int J Mol Med* 7: 501-505
- Claussen U**, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, (2002) Demystifying chromosome preparation and the implications for a concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res* 98: 136-146

- Dauwerse JG**, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, van Ommen GJ (1992) Multiple colors by fluorescence *in situ* hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet* 1: 593-598
- de Grouchy J**, Turleau C, Finaz C (1978) Chromosomal phylogeny of the primates. *Ann Rev Genet* 12: 289-328
- Diaz MO**, Le Beau MM, Harden A, Rowley JD (1985) Trisomy 8 in human hematologic neoplasias and the c-myc and c-mos oncogenes. *Leuk Res* 9: 1437-1442
- du Manoir S**, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic *in situ* hybridization. *Hum Genet* 90: 590-610
- Dutrillaux B und Lejeune J** (1971) Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C R Acad Sci* 272: 2638-2640
- Dutrillaux B**, Rethore MO, Prieur M, Lejeune J (1973) Analysis of the structure of chromatids of *Gorilla gorilla*. Comparison with *Homo sapiens* and *Pan troglodytes*. *Humangenetik* 20: 343-354
- Dutrillaux B** (1980) Chromosomal evolution of the great apes and man. *J Reprod Fert* 28: 105-111
- Edelmann L**, Spiteri E, Koren K, Pulijaal V, Bialer MG, Shanske A, Goldberg R, Morrow BE (2001) AT-rich palindromes mediate the constitutional t(11;22) translocation. *Am J Hum Genet* 68: 1-13
- Edwards JH**, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH (1960) A new trisomic syndrome. *Lancet* 1: 787-790
- Fayad L**, Kantarjian H, O'Brien S, Seong D, Albitar M, Keating M, Talpaz M (1997) Emergence of new clonal abnormalities following interferon-alpha induced complete cytogenetic response in patients with chronic myeloid leukemia: report of three cases. *Leukemia* 11: 767-771
- Ferro MT**, Steegman JL, Escribano L, Heiurichs B, Parada L, Garcia-Sagredo JM, Resino M, Cabello P, San Roman C (1992) Ph-positive chronic myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22) in blastic crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 58: 96-99
- Fleischman EW**, Reshmi S, Sokova OI, Kirichenko OP, Konstantinova LN, Kulagina OE, Frenkel MA, Rowley JD (1999) Increased karyotype precision using fluorescence *in situ* hybridization and spectral karyotyping in patients with myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 15: 166-170
- Ford CE**, Miller OJ, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH (1959) A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* 1: 711-713
- Gardner RJMcK und Sutherland GR** (1989) Chromosome abnormalities and genetic counseling Oxford Monographs on medical Genetics, Oxford University Press
- Gall G und Pardue ML** (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytogenetical preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63: 378-381
- Gebhart E**, Neubauer S, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J (1996) Use of a three-color chromosome *in situ* suppression technique for the detection of past radiation exposure. *Radiat Res* 145: 47-52
- Gebhart E**, Verdorfer I, Saul W, Trautmann U, Brecevic L (2000) Delimiting the use of comparative genomic hybridization in human myeloid neoplastic disorders. *Int J Oncol* 16:1099-1105
- Giacalone JP und Francke U** (1992) Common sequence motifs at the rearrangement sites of a constitutional X/autosome translocation and associated deletion. *Am Hum Genet* 50: 725-741

- Giardino D**, Finelli P, Caufin D, Gottardi G, Lo Vasco R, Turolla L, Larizza L (2002) Pure 6p22-pter trisomic patient: refined FISH characterization and genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 108: 36-40
- Gisselsson D**, Hoglund M, Mertens F, Johansson B, Dal Cin P, Van den Berghe H, Earnshaw WC, Mitelman F, Mandahl N (1999) The structure and dynamics of ring chromosomes in human neoplastic and non-neoplastic cells. *Hum Genet* 104: 315-325
- Gisselsson D**, Mandahl N, Palsson E, Gorunova L, Hoglund M (2000) Locus-specific multicolor FISH analysis allows physical characterization of complex chromosome abnormalities in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 28: 347-352
- Gisselsson D**, Palsson E, Hoglund M, Domanski H, Mertens F, Pandis N, Sciort R, Dal Cin P, Bridge JA, Mandahl N. (2002) Differentially amplified chromosome 12 sequences in low- and high-grade osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 133-140
- Gitschier J**, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312: 326-330
- Goodpasture C** und **Bloom SE** (1975) Visualization of nucleolar organizer regions. III. Mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50
- Hamerton JL**, Fraccaro M, Carli L, Nuzzo F, Klinger HP, Hullinger L, Tayler A, Lang EM (1961) Somatic chromosomes of the Gorilla. *Nature* 192: 225-228
- Hamerton JL**, Klinger HP, Mutton DE, Lang EM (1963) The somatic chromosomes of the Hominoidea. *Cytogenetics* 2: 240-263
- Hamerton JL**, Canning N, Ray M, Smith J (1975) A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants: Incidence of chromosomal abnormalities. *Clin Genet* 8: 223-243
- Han JY**, Choo KH, Shaffer LG (1994) Molecular cytogenetic characterization of 17 rob(13q14q) Robertsonian translocations by FISH, narrowing the region containing the breakpoints. *Am J Hum Genet* 55: 960-967
- Harada T**, Shiraishi K, Kusano N, Umayahara K, Kondoh S, Okita K, Sasaki K (2000) Evaluation of the reliability of chromosomal imbalances detected by combined use of universal DNA amplification and comparative genomic hybridization. *Jpn J Cancer Res* 91: 1119-1125
- Harrison CJ**, Yang F, Butler T, Cheung KL, O'Brien PC, Hennessy BJ, Prentice HG, Ferguson-Smith M (2001) Cross-species color banding in ten cases of myeloid malignancies with complex karyotypes. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 15-24
- Hecht F**, Morgan R, Hecht BK (1988) Robertsonian chromosome recombinants are rare in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 35: 79-81
- Heller A**, Chudoba I, Bleck C, Senger G, Claussen U, Liehr T (2000) Microdissection based comparative genomic hybridization analysis (micro-CGH) of secondary acute myelogenous leukemias. *Int J Oncol* 16: 461-468
- Heller A**, Seidel J, Hübler A, Starke H, Beensen V, Senger G, Rocchi M, Wirth J, Chudoba I, Claussen U, Liehr T (2000a) Molecular cytogenetic characterisation of partial trisomy 9q in a case with pyloric stenosis and a review. *J Med Genet* 37: 529-532
- Heller A**, Starke H, Trifonov V, Rubtsov N, Wedding U, Loncarevic I, Bleck C, Claussen U, Liehr T (2002) A complex translocation event between the two homologues of chromosomes 5 leading to a del(5)(q21q33) as a sole aberration in a case clinically diagnosed as CML: characterization of the aberration by multicolor banding. *Int J Oncol* 20: 1179-1181
- Heller A**, Rubtsov N, Kytola S, Karamysheva TV, Sablina OV, Degtyareva MM, Starke H, Metzke H, Claussen U, Liehr T (2003) Highly complex karyotypic changes in acute myelogenous leukemia: a case report. *Int J Oncol* 23: 139-143

- Heller A**, Brecevic L, Glaser M, Loncarevic IF, Gebhart E, Claussen U, Liehr T (2003 in press-a) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a Comprehensive molecular cytogenetic analysis reveals no cryptic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*
- Heller A**, Trifonov V, Rubtsov N, Sauerbrey A, Starke H, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T (2003 in press-b) Complex chromosomal rearrangements in a secondary acute myeloblastic leukemia after chemotherapy in TRAPS. *Int J Onc*
- Heller A**, Fricke HJ, Starke H, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T (2003 in press-c) Characterization of a highly aberrant plasma cell leukemia karyotype: a case report. *Oncology reports*
- Heller A**, Loncarevic IF, Glaser M, Gebhart E, Trautmann U, Claussen U, Liehr T Breakpoint differentiation in chromosomal aberrations of hematological malignancies – Identification of 33 previously unrecorded breakpoints. *Int J Onc* – submitted
- Henegariu O**, Vance GH, Heiber D, Pera M, Heerema NA (1998) Triple-color FISH analysis of 12p amplification in testicular germ-cell tumors using 12p band-specific painting probes. *J Mol Med* 76: 648-655
- Heng HH**, Squire J, Tsui LC (1992) High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9509-9513
- Henic N**, Fenaux P, Lai JL, Preudhomme (1995) cRNA for reverse PCR analysis can be obtained from bone marrow cells prepared for cytogenetic analysis and stored at -20 degrees C for several years. *Leukemia* 9: 1409-1411
- Herrmann T** und **Baumann M** (1997) Klinische Strahlenbiologie. 3. Auflage Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart Lübeck Ulm
- Hilgenfeld E**, Padilla-Nash H, Schrock E, Ried T (1999) Analysis of B-cell neoplasias by spectral karyotyping (SKY). *Curr Top Microbiol Immunol* 246: 169-174
- Hliscs R**, Mühlig P, Claussen U (1997a) The nature of G-bands analyzed by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 79: 162-166
- Hliscs R**, Mühlig P, Claussen U (1997b) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76: 167-71
- Hopman AH**, Wiegant J, Raap AK, Landegent JE, van der Ploeg M, van Duijn P (1986) Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive *in situ* hybridization. *Histochemistry* 85: 1-4
- Ichikawa H**, Shimizu K, Hayashi Y, Ohki M. (1994) An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Cancer Res* 54: 2865-2868
- International Human Genome Sequencing Consortium [IHGSC]** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- ISCN, 1995** – An international System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995 Felix Mitelman (ed) S. Karger Verlag, Basel
- Jacobs PA** und **Strong JA** (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* 183: 302-303
- Jalal SM** and Law ME (1999) Utility of multicolor fluorescent *in situ* hybridization in clinical cytogenetics. *Genet Med* 1: 181-186
- Jauch A**, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T, Cremer T (1992) Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8611-8615

- John HL**, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:912-913
- Kakazu N**, Ashihara E, Hada S, Ueda T, Sasaki H, Terada M, See TA (2001) Development of spectral colour banding in cytogenetic analysis. *Lancet* 357: 529-530
- Kakazu N**, Bar-Am I, Hada S, Ago H, Abe T (2003) A new chromosome banding technique, spectral color banding (SCAN), for full characterization of chromosomal abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 412-416
- Kalitsis P**, Earle E, Vissel B, Shaffer LG, Choo KH (1993) A chromosome 13-specific human satellite I DNA subfamily with minor presence on chromosome 21: further studies on Robertsonian translocations. *Genomics* 16: 104-112
- Kallioniemi A**, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821
- Kallioniemi OP**, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4: 41-46 Review
- Kallioniemi OP**, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 231-243
- Kebelmann-Betzing C**, Seeger K, Kulozik A, Henze G, Liehr T, Heller A, Teigler-Schlegel A (2000) Secondary acute myeloid leukemia after treatment of acute monoblastic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1897-1898
- Knippers R**, Hrsg. (2001) Molekulare Genetik, 8. Auflage, Georg Thieme Verlage, Stuttgart, New York
- Koduru P** und **Chaganti R** (1988) Congenital chromosome breakage clusters within Giemsa-light bands and identifies sites of chromatin instability. *Cytogenet Cell Genet* 49: 269-274
- Koehler U**, Bigoni F, Wienberg J, Stanyon R (1995) enomic reorganization in the concolor gibbon (*Hylobates concolor*) revealed by chromosome painting. *Genomics* 30: 287-292
- Kong XT**, Ida K, Ichikawa H, Shimizu K, Ohki M, Maseki N, Kaneko Y, Sako M, Kobayashi Y, Tojou A, Miura I, Kakuda H, Funabiki T, Horibe K, Hamaguchi H, Akiyama Y, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y (1997) Consistent detection of TLS/FUS-ERG chimeric transcripts in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22) and identification of a novel transcript. *Blood* 90: 1192-1199
- Koo SH**, Kwon KC, Park JW, Lee YE, Kim JW (2000) Characterization of chromosomal breakpoints in an ALL patient using cross-species color banding. *Cancer Genet Cytogenet* 119: 118-120
- Küchler A**, Mueller CR, Liehr T, Claussen U (2001) Detection of microdeletions in the short arm of the X chromosome by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 95: 12-16
- Kuwano A**, Ledbetter SA, Dobyns WB, Emanuel BS, Ledbetter DH. (1991) Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by *in situ* hybridization. *Am J Hum Genet* 49: 707-714
- Langabeer SE**, Grimwade D, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC (1998) A study to determine whether trisomy 8, deleted 9q and trisomy 22 are markers of cryptic rearrangements of PML/RARalpha, AML1/ETO and CBFβ/MYH11 respectively in acute myeloid leukaemia. MRC Adult Leukaemia Working Party. Medical Research Council. *Br J Haematol* 101: 338-340

- Langer PR**, Waldrop AA, Ward DC (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6633-6637
- Larsen J**, Ottesen AM, Lundsteen C, Leffers H, Larsen JK (2001) Optimization of DOP-PCR amplification of DNA for high-resolution comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry* 44: 317-325
- Larson RS** und **Butler MG** (1995) Use of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the diagnosis of DiGeorge sequence and related diseases. *Diagn Mol Pathol* 4: 274-278
- Latour P**, Boutrand L, Levy N, Bernard R, Boyer A, Claustrat F, Chazot G, Boucherat M, Vandenberghe A (2001) Polymorphic short tandem repeats for diagnosis of the Charcot-Marie-Tooth 1A duplication. *Clin Chem* 47: 829-837
- Lee C**, Wevrick R, Fisher RB, Ferguson-Smith MA, Lin CC (1997) Human centromeric DNAs *Human Genet* 100: 291-304
- Lejeune J** (1959) Le Mongolisme: Premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet Sem Hop* 1: 41-49
- Lejeune J**, Dutrillaux B, Rethore MO, Prieur M (1973) Comparison of the structure of chromatids of *Homo sapiens* and *Pan troglodytes* *Chromosoma* 43: 423-444
- Lemke J**, Chudoba I, Senger G, Stumm M, Loncarevic IF, Henry C, Zabel B, Claussen U (2001) Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multicolour banding. *Hum Genet* 108: 478-483
- Lemke J**, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Muhlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U (2002) The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71: 1051-1059
- Lengauer C**, Green ED, Cremer T (1992) Fluorescence *in situ* hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* 13: 826-828
- Lengauer C**, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D, Cremer T (1993) Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet* 2: 505-512
- Levan A** (1938) The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas* 24: 471-486
- Li S**, Ilaria RL Jr, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA (1999) The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* 189: 1399-1412
- Lichter P**, Bentz M, Joos S (1995) Detection of chromosomal aberrations by means of molecular cytogenetics: painting of chromosomes and chromosomal subregions and comparative genomic hybridization. *Methods Enzymol* 254: 334-359
- Lichter P**, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224-234
- Lichter P**, Joos S, Bentz M, Lampel S (2000) Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 37: 348-357
- Liehr T**, Pfeiffer R A, Trautmann U (1992) Typical and partial cat eye syndrome: identification of the marker chromosome by FISH. *Clin Genet* 42: 91-96
- Liehr T** und **Rautenstrauss B** (1995) Regional localization of rat peripheral myelin protein 22 (Pmp22) gene to chromosome 10q22 by FISH. *Mamm Genome* 6: 489

- Liehr T und Claussen U (2002)** Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr Mol Med* 2: 283-297
- Liehr T und Claussen U (2002a)** Multicolor-FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. *Current Genomics* 3: 213-235 Review
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U (2002)** Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 9: 335-339
- Liehr T, Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Weier HU, Claussen U (2002a)** Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res* 97: 43-50
- Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U (2002b)** FISH banding methods: applications in research and Diagnostic. *Expert Rev Mol Diagn* 2: 217-225
- Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B (1990)** Construction and characterization of band-specific DNA libraries. *Hum Genet* 84:512-516
- Lupski JR (1998)** Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14: 417-422 Review
- Madan K (1995)** Paracentric inversions: a review. *Hum Genet* 96: 503-515 Review
- Malcolm S (1996)** Microdeletion and microduplication syndromes. *Prenat Diagn* 16: 1213-1219
- Maserati E, Aprili F, Vinante F, Locatelli F, Amendola G, Zatterale A, Milone G, Minelli A, Bernardi F, Lo Curto F, Pasquali F (2002)** Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15-20 % of cases. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 93-97
- Maxam und Gilbert (1977)** A new method for sequencing DNA. *Proc Nat Acad Sci U S A* 74: 560-564
- McTaggart KE, Budarf ML, Driscoll DA, Emanuel BS, Ferreira P, McDermid HE (1998)** Cat eye syndrome chromosome breakpoint clustering: identification of two intervals also associated with 22q11 deletion syndrome breakpoints. *Cytogenet Cell Genet* 81: 222-228
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F (1998)** Catalog of chromosome aberrations in cancer Wiley-Liss, New York
- Mohr B, Bornhauser M, Thiede C, Schakel U, Schaich M, Illmer T, Pascheberg U, Ehninger G. (2000)** Comparison of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in 39 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 14: 1031-1038
- Montefalcone G, Tempesta S, Rocchi M, Archidiacono N (1999)** Centromere repositioning. *Genome Res* 9: 1184-1188
- Moyzis RK, Albright KL, Bartholdi MF, Cram LS, Deaven LL, Hildebrand SE, Joste NE, Longmire JL, Meyne J, Schwarzbacher-Robinson T (1987)** Human chromosome-specific repetitive sequences: Novel markers for genetic analysis. *Chromosoma* 375-386
- Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Rocchi M, Claussen U, Liehr T (2001)** Reconstruction of the female Gorilla gorilla karyotype by Zoo-FISH using 25-color FISH and multicolor banding (MCB). *Cytogenet Cell Genet* 93: 242-248
- Mrasek K, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Claussen U, Liehr T (2003)** Detailed Hylobates lar karyotype defined by 25-color FISH and multicolor banding. *Int J Mol Med* 12: 139-146

- Mülhardt C (2002)** Der Experimentator: Molekularbiologie, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- Müller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1997)** Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet* 100: 271-278
- Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1998)** Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33: 445-452
- Müller S und Wienberg J (2000)** Advances in the development of chromosome bar codes: Intergration of M-FISH and Rx-FISH technology *medgen* 12: 474-477
- Müller S und Wienberg J (2001)** "Bar-coding" primate chromosomes: molecular cytogenetic screening for the ancestral hominoid karyotype. *Hum Genet* 109: 85-94
- Musio A, Mariani T, Vezzoni P, Frattini A (2002)** Heterogeneous gene distribution reflects human genome complexity as detected at the cytogenetic level. *Cancer Genet Cytogenet* 134: 168-171
- Nadeau JH und Taylor BA (1984)** Lengths of chromosomal segments conserved since divergence of man and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 814-818
- Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK (1989)** Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10: 20-27
- Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M (1990)** Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 11: 126-131
- Nederlof PM, van der Flier S, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK (1992)** Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple *in situ* hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry* 13: 839-845
- Neizel H (1986)** A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 73: 320-326
- Nie W, Rens W, Wang J, Yang F (2001)** Conserved chromosome segments in Hylobates hoolock revealed by human and H. leucogenys paint probes. *Cytogenet Cell Genet* 92: 248-253
- Nietzel A, Rocchi M, Heller A, Starke H, Wlodarska I, Beensen V, Claussen U, Liehr T (2001)** A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108: 199-204
- Nietzel A, Albrecht B, Starke H, Heller A, Gillessen-Kaesbach G, Claussen U, Liehr T (2003)** Partial hexasomy 15pter-->15q13 including SNRPN and D15S10: first molecular cytogenetically proven case report. *J Med Genet* 40: e28
- Ning Y, Laundon CH, Schrock E, Buchanan P, Ried T (1999)** Prenatal diagnosis of a mosaic extra structurally abnormal chromosome by spectral karyotyping. *Prenat Diagn* 19: 480-482
- Nowell PC und Hungerford DA (1960)** A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497
- O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womak JE, Marshall Graves JA (1999)** The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286: 458-481
- Page SL, Shin JC, Han JY, Choo KH, Shaffer LG (1996)** Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. *Hum Mol Genet* 5: 1279-1288
- Page SL und Shaffer LG (1997)** Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. *Nat Genet* 15: 231-232

- Pätau K**, Smith DW, Therman E, Inborn SL, Wagner HP (1960) Multiple congenital anomaly caused by an extra chromosome. *Lancet* 1: 790-793
- Paulsson K**, Fioretos T, Strombeck B, Mauritzson N, Tanke HJ, Johansson B (2003) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a multicolor and locus-specific fluorescence *in situ* hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 1: 66-69
- Pentao L**, Wise CA, Chinault AC, Patel PI, Lupski JR (1992) Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet* 2: 292-300
- Peschka B**, Leygraaf J, Hansmann D, Hansmann M, Schrock E, Ried T, Engels H, Schwanitz G, Schubert R (1999) Analysis of a de novo complex chromosome rearrangement involving chromosomes 4, 11, 12 and 13 and eight breakpoints by conventional cytogenetic, fluorescence *in situ* hybridization and spectral karyotyping. *Prenat Diagn* 19: 1143-1149
- Pettenati MJ**, Rao PN, Phelan MC, Grass F, Rao KW, Cosper P, Carroll AJ, Elder F, Smith JL, Higgins MD, et al. (1995) Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet* 55: 171-187
- Pevzner P und Tesler G** (2003) Human and mouse genomic sequences reveal extensive breakpoint reuse in mammalian evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7672-7677
- Phelan MC**, Blackburn W, Rogers RC, Crawford EC, Cooley NR Jr, Schrock E, Ning Y, Ried T (1998) FISH analysis of a complex chromosome rearrangement involving nine breakpoints on chromosomes 6, 12, 14 and 16. *Prenat Diagn* 18: 1174-1180
- Pinkel D**, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2934-2938
- Polani PE**, Briggs JH, Ford CE, Clarke CM, Berg JM (1960) A mongol girl with 46 chromosomes. *Lancet* 1: 721
- Richardson C**, Moynahan ME, Jasin M (1998) Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev* 12: 3831-3842
- Riordan JR**, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073
- Rigby PW**, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251
- Riva P**, Corrado L, Natacci F, Castorina P, Wu BL, Schneider GH, Clementi M, Tenconi R, Korf BR, Larizza L (2000) NF1 microdeletion syndrome: refined FISH characterization of sporadic and familial deletions with locus-specific probes. *Am J Hum Genet* 66: 100-109
- Rooney DE und Czepulkowski BH** (1992) Human Cytogenetics - A Practical Approach. Second Ed. New York: Oxford University Press
- Rubtsov N**, Senger G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Claussen U (1996) Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. *Hum Genet* 97: 705-709
- Saglio G**, Storlazzi CT, Giugliano E, Surace C, Anelli L, Rege-Cambrin G, Zagaria A, Jimenez Velasco A, Heiniger A, Scaravaglio P, Torres Gomez A, Roman Gomez J, Archidiacono N, Banfi S, Rocchi M (2002) A 76-kb duplicon maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of the Philadelphia chromosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9882-9887

- Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 20: 1350-1354
- Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sankoff D**, Deneault M, Turbis P, Allen C (2002) Chromosomal distributions of breakpoints in cancer, infertility, and evolution. *Theor Popul Biol* 61: 497-501
- Scalenghe F**, Turco E, Edstrom JE, Pirrotta V, Melli M (1981) Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 82: 205-216
- Scheurlen WG**, Schwabe GC, Seranski P, Joos S, Harbott J, Metzke S, Dohner H, Poustka A, Wilgenbus K, Haas OA (1999) Mapping of the breakpoints on the short arm of chromosome 17 in neoplasms with an i(17q). *Genes Chromosomes Cancer* 25: 230-240
- Schlessinger D** (1990) Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes. *Trends Genet* 6: 255-258
- Schmidt H**, Uhrig S, Lederer G, Murken J, Speicher MR, Schuffenhauer S (2000) Mosaicism for a dup(12)(q22q13) in a patient with hypomelanosis of Ito and asymmetry. *J Med Genet* 37: 804-807
- Schoch C**, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Löffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W; German AML Cooperative Study Group (2001) Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 112: 118-126
- Schröck E**, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497
- Schröck E**, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S, Shaffer LG, Papenhausen P, Kozma C, Phelan MC, Kjeldsen E, Schonberg SA, O'Brien P, Biasecker L, du Manoir S, Ried T. (1997) Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet* 101: 255-262
- Schwartz S** und **Graf MD** (2002) Microdeletion syndromes. Characteristics and diagnosis. *Methods Mol Biol* 204: 275-290
- Seabright M** (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972
- Seidel J**, Heller A, Senger G, Starke H, Chudoba I, Kelbova C, Tönnies H, Neitzel H, Haase C, Beensen V, Zintl F, Claussen U, Liehr T (2003) A multiple translocation event in a patient with hexadactyly, facial dysmorphism, mental retardation and behavior disorder characterized comprehensively by molecular cytogenetics – Case report and review of the literature. *Eur J Ped* 162: 582-588
- Senger G**, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brondum-Nielsen K (1997) Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenatal Diagnosis* 17: 369-374
- Senger G**, Chudoba I, Plesch A (1998) Multicolor-FISH - the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *BIOforum* 9: 499-503
- Shaffer LG**, Jackson-Cook CK, Stasiowski BA, Spence JE, Brown JA (1992) Parental origin determination in thirty de novo Robertsonian translocations. *Am J Med Genet* 43: 957-963
- Shaffer LG** und **Lupski JR** (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34: 297-329

- Shaikh TH**, Kurahashi H, Emanuel BS (2001) Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med* 3: 6-13
- Shimizu K**, Ichikawa H, Tojo A, Kaneko Y, Maseki N, Hayashi Y, Ohira M, Asano S, Ohki M (1993) An ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10280-10284
- Shizuya H**, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Smon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8794-8797
- Soligo D**, Romitti L, Bertolli V, Della Volpe A, Annaloro C, Lambertenghi Delilieri G (1995) 5q- in a case of chronic myelogenous leukemia relapsed after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* 80: 437-439
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Speicher MR**, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375
- Speicher MR**, Petersen S, Uhrig S, Jentsch I, Fauth C, Eils R, Petersen I (2000) Analysis of chromosomal alterations in non-small cell lung cancer by multiplex-FISH, comparative genomic hybridization, and multicolor bar coding. *Lab Invest* 80: 1031-1041
- Stankiewicz P und Lupski JR** (2002) Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 12: 312-319 Review
- Stankiewicz P**, Park SS, Inoue K, Lupski JR (2001) The evolutionary chromosome translocation 4;19 in Gorilla gorilla is associated with microduplication of the chromosome fragment syntenic to sequences surrounding the human proximal CMT1A-REP. *Genome Res* 11: 1205-1210
- Stankiewicz P**, Shaw CJ, Dapper JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M, Elizondo L, Park SS, Lupski JR (2003) Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet* 72: 1101-1116
- Stanyon R**, Wienberg J, Romagno D, Bigoni F, Jauch A, Cremer T (1992) Molecular and classical cytogenetic analyses demonstrate an apomorphic reciprocal chromosomal translocation in Gorilla gorilla. *Am J Phys Anthropol* 88: 245-250
- Starke H**, Raida M, Trifonov V, Clement JH, Loncarevic IF, Heller A, Bleck C, Nietzel A, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T (2001) Molecular cytogenetic characterization of an acquired supernumerary minute marker chromosome as sole abnormality in a case clinically diagnosed as Philadelphia negative chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 113: 435-438
- Starke H**, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T (2002) Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 10: 790-800
- Starke H**, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Küchler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. (2003 – in press) Small supernumerary marker chromosomes (SMC): genotype – phenotype correlation and classification. *Hum Genet*
- Steinhäuser U**, Starke H, Nietzel A, Lindenau J, Ullmann P, Claussen U, Liehr T (2002) Suspension S-FISH a new technique for interphase. *J Histochem Cytochem* 50: 1697-1698
- Strachan T und Read AP** (1996) Molekulare Humangenetik. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag

- Strehl S**, König M, Mann G, Haas OA (2001) Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1: 805-808
- Stumm M**, Neubauer S, Keindorff S, Wegner RD, Wieacker P, Sauer R (2001) High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone syndromes ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 92: 186-191
- Sutherland GR** und **Simmers RN** (1988) No statistical association between common fragile sites and nonrandom chromosome breakpoints in cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 31:9-15
- Sutton WS** (1903) The chromosome inheritance. *Biol Bull* 4: 231-248
- Tanke HJ**, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J (1999) New strategy for multi-colour fluorescence *in situ* hybridisation: COBRA: COmbined Binary Ratio labelling. *Eur J Hum Genet* 7: 2-11
- Tantravahi R**, Dev VG, Firschein IL, Miller DA, Miller OJ. (1975) Karyotype of the gibbons *hylobates lar* and *h. moloch* inversion in chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 15: 92-102
- Teixeira MR**, Micci F, Dietrich CU, Heim S (1999) Cross-species color banding characterization of chromosomal rearrangements in leukemias with incomplete G-band karyotypes. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 13-19
- Telenius H**, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BA (1992a) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257-263
- Telenius H**, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992b) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-25
- Tijio JH** und **Levan A** (1956) The chromosome number in man. *Hereditas* 42: 1-6
- Tönnies H**, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H (2001) Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics. *Cytogenet Cell Genet* 93: 188-194
- Trifonov V**, Seidel J, Starke H, Martina P, Beensen V, Ziegler M, Hartmann I, Heller A, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2003) Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Prenat Diagn* 23: 427-430
- Turleau C**, de Grouchy J, Klein M (1972) Chromosomal phylogeny of a man and the anthropomorphic primates. *Ann Genet* 15: 225-240
- Uhrig S**, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Müller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR (1999) Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostics applications. *Am J Hum Genet* 65: 448-462
- Ungaro P**, Christian SL, Fantes JA, Mutirangura A, Black S, Reynolds J, Malcolm S, Dobyns WB, Ledbetter DH (2001) Molecular characterisation of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14. *J Med Genet* 38: 26-34
- van den Berg A**, van der Veen AY, Hulsbeek MM, Kovacs G, Gemmill RM, Drabkin HA, Buys CH (1995) Defining the position of the breakpoint of the constitutional t(3;6) occurring in a family with renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 224-228
- Veldman T**, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T (1997) Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat Genet* 15: 406-410

- Venter JC**, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO et al., (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Verma RS** und **Babu A** (1994) Human chromosomes: Principles and techniques. 2nd ed. McGraw-Hill, Inc.
- Wahls P**, Wallace LJ, Moore PD (1990) Hypervariable minisatellite DNA is a hotspot for homologous recombination in human cells. *Cell* 60: 95-103
- Waldeyer W** (1888) Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat* 32: 1-22
- Watson JD** und **Crick FH** (1953) General implications of the structure of deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 964-967
- Weise A**, Starke H, Heller A, Tonnies H, Volleth M, Stumm M, Gabriele S, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2002) Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterised by high resolution multicolour banding and region specific FISH probes. *J Med Genet* 39: 434-439
- Wienberg J** und **Stanyon R** (1997) Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 7: 784-791
- Wieser R**, Schreiner U, Rieder H, Pirc-Danoewinata H, Gruner H, Loncarevic IF, Fonatsch C (2003) Interphase fluorescence *in situ* hybridization assay for the detection of rearrangements of the EVI-1 locus in chromosome band 3q26 in myeloid malignancies. *Haematologica* 88:25-30
- Wilson GN**, Hollar BA, Wateron JR, Schmickel RD (1978) Molecular analysis of cloned human 18S ribosomal DNA segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5367-5371
- Wu JC** und **Manuelidis L** (1980) Sequence definition and organization of a human repeated DNA. *J Mol Biol* 142: 363-86
- Wu HK**, Heng HHQ, Shi XM, Forsdyke DR, Tsui LC, Mak TW, Minden MD, Siderovski DP (1995) Differential expression of a basic helix-loop-helix phosphoprotein gene, G0S8, in acute leukemia and localization to human chromosome 1q31. *Leukemia* 9: 1291-1298
- Yan J**, Marceau D, Drouin R (2001) Tetrasomy 8 is associated with a major cellular proliferative advantage and a poor prognosis. two cases of myeloid hematologic disorders and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 125: 14-20
- Yunis JJ** (1976) High resolution of human chromosomes. *Science* 191: 1268-1270
- Yunis JJ** und **Prakash O** (1982) The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* 215: 1525-1530
- Zamecnikova A**, Krizana P, Gyarfás J, Vahancik A (2001) Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia with a 5q- abnormality in a patient following interferon-alpha therapy. *Cancer Genet Cytogenet* 127: 134-139
- Zhao L**, Hayes K, Glassman A (2000) Enhanced detection of chromosomal abnormalities with the use of RxFISH multicolor banding technique. *Cancer Genet Cytogenet* 118: 108-111

Elektronische Datenbanken:

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology **-edb1**
<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/>

CEPH YAC library **-edb2**
http://www.cephb.fr/bio/ceph_yac.html

Geneatlas **-edb3**
http://bisance.citi2.fr/GENATLAS/menu_an.html

Liehr, 2003 / homepage **-edb4**
<http://mti-n.mti.uni-jena.de/~huwww/human.htm>

National Center for Biotechnology Information **-edb5**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI – PubMed **-edb6**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=PubMed>

NCBI – Blast **-edb7**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

Online Mendelian Inheritance in Man (=OMIM) **-edb8**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Resources for molecular cytogenetics (Rocchi) **-edb9**
<http://www.biologia.uniba.it/rmc/>

The Cancer Genome Anatomy Project (Mitelman database) **-edb10**
<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/AbnCytSearchForm>

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
acro-cenM-FISH	Multicolor-FISH der Zentromere und kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen
AgNO ₃	Silbernitrat
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
<i>Aqua ad</i>	<i>Aqua ad iniectabilia</i> (Braun)
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
Ba(OH) ₂	Bariumhydroxid
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CBG	C-Bänderung
CCD-Kamera	<i>charge-coupled device</i> -Kamera (= gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor)
c-DNA	komplementäre DNA
cen/cep	Zentromer
cen-BAC	zentromernahe BAC-Sonde
cenM-FISH	Zentromer-spezifisches Multicolor-FISH
cen54M-FISH	Zentromer-spezifisches Multicolor-FISH mit midi 54
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i> (Vergleichende Genomhybridisierung)
Chr.	Chromosom
CISS-Hybridisierung	Chromosomen- <i>in-situ</i> -Suppressions-Hybridisierung
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
COBRA	<i>C</i> ombined <i>B</i> inary <i>R</i> atio <i>l</i> abelling
Cy	Cyanin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DEAC	Diethylaminocoumarin-5-dUTP
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP	degenerierte Oligonukleotid-Primer
DOP-PCR	Polymerase Kettenreaktion mit degenerierten Oligonukleotid-Primern
ds	doppelsträngig
DS	Dextransulfat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
edb	Elektronische Datenbank
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälber Serum
Fluo	Fluorescein-12-dUTP
G-Bänderung	siehe GTG
GGO	<i>Gorilla gorilla</i>
GTG	<i>G</i> -bands by <i>T</i> rypsin using <i>G</i> iemsa
HCl	Salzsäure
HLA	<i>Hylobates lar</i>
H ₂ O	Wasser
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
k.A.	keine Angabe
KCl	Kaliumchlorid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCR	<i>low-copy-repeat</i>
LSI	lokusspezifische Sonde
Mb	Megabasenpaare
MCB	Multicolor-Bänderung
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
M-FISH	Multicolor-FISH
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
<i>Micro-CGH</i>	CGH nach Mikrosezierung von Kernen

mid	<i>microdissection</i> – Mikrosezierung oder Mikrosezierungsbank
MPP	Metaphaseplatten
MPS	Myelodysplastisches Syndrom
m-RNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphatpuffer
NaOH	Natronlauge
NOR	Nukleolus-organisierende Regionen
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
OT	Objektträger (Einzahl)
OTs	Objektträger (Mehrzahl)
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung)
pcp	<i>partial chromosome painting</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
q	langer Arm eines Chromosoms
RAEB	refraktäre Anämie mit Blastenexzeß
RAEBt	refraktäre Anämie mit Blastenexzeß in Transformation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpcp	<i>region specific partial chromosome painting</i>
<i>RPMI-1640</i>	Wachstumsmedium
r-RNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
Rx-FISH	<i>cross-species color banding</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SG	<i>Spectrum Green-dUTP</i>
SKY	<i>Spectral karyotyping</i>
SMC	<i>supernumerary marker chromosome</i>
SO	<i>Spectrum Orange-dUTP</i>
SR	<i>Spectrum Red-dUTP</i>
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat
SSW	Schwangerschaftswoche
sub-cen-Mix	Sub-Zentromer-Mix
subtel	Sub-Telomersonde
TAE	Tris-Eisessig-EDTA (Puffer)
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
tel	Telomer
TR	<i>Texas Red-12-dUTP</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Puffer)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tween	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
U	Unit
UFW	unkultiviertes Fruchtwasser
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
V.a.	Verdacht auf
wcp	<i>whole chromosome painting</i>
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
#	Chromosom

Abkürzungen von Nukleotiden

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
N =	A (Adenosin)
	C (Cytosin)
	G (Guanosin)
	T (Thymidin)
	U (Uridin)

8 Anhang

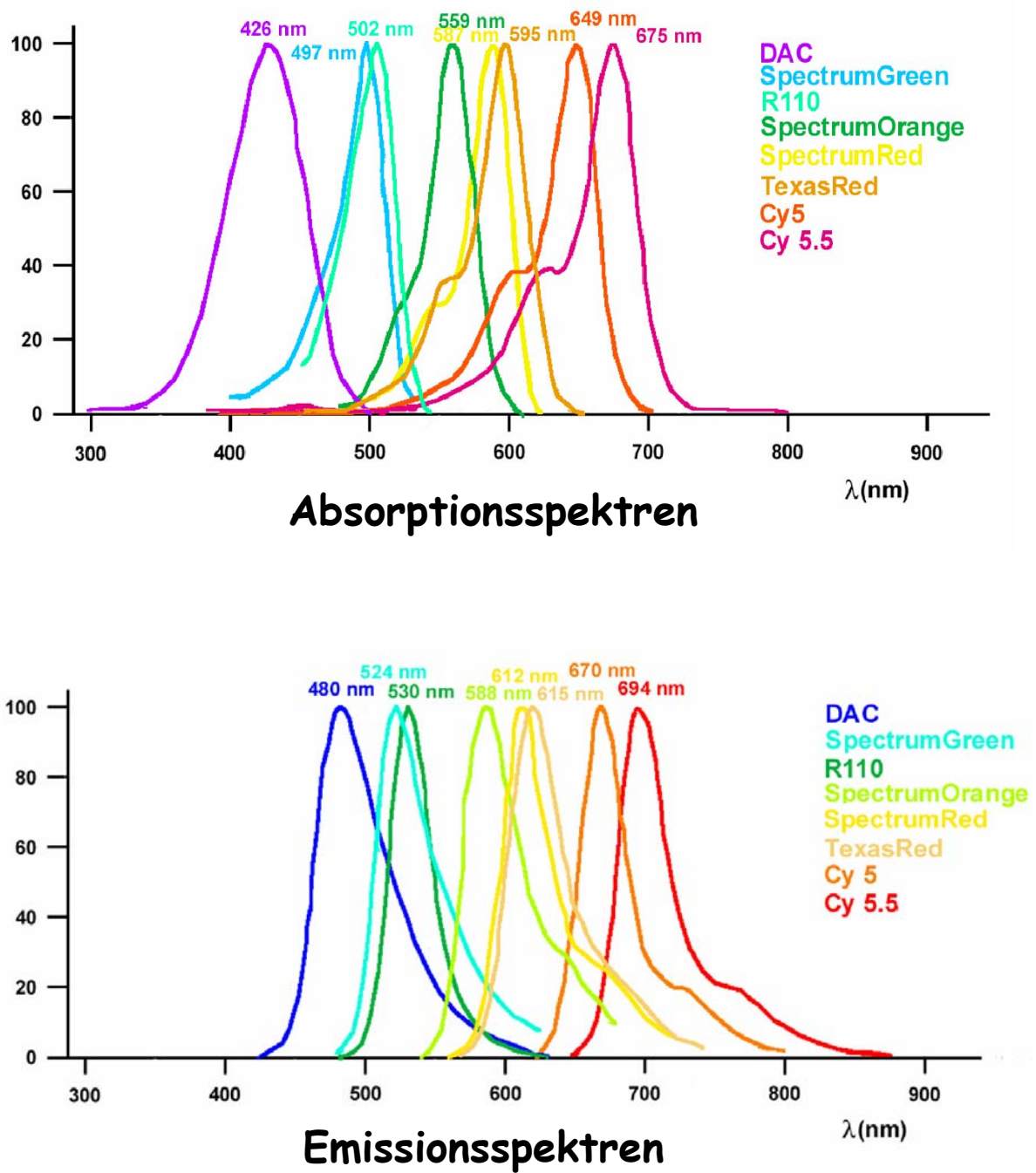


Abb. 8.1

Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe

Die Spektren von SpectrumGreen und Fluorescein-12-dUTP sind praktisch identisch, daher ist Fluorescein-12-dUTP hier nicht extra eingezeichnet.

(DAC = Diethylaminocoumarin-5-dUTP)

Abb. 8.2
Sequenzierungsergebnisse der *FUS-ERG*-Fusion

Sequenzdaten mit Primer *T1 – codierender Strang

FUS

```
5' TGGCGTGGAG CAGAGGTGGC ATGGGCGGAA GTGACCGTGG TGGCTTCAAT  
AAATTTGGTG ATTTACCATA TGAGCCCCC AGGAGATCAG CCTGGACCGG  
TCACGGCCAC CCCACGCCCC AGTCGAAAGC TGCTCAACCA TCTCCTTCCA  
CAGTGCCCAA AACTGAAGAC CAGCGTCCTC AGTTAGATCC TTATCAGATT  
TCTTGACCA ACAAGTAGCC GCCTTGCAA TC 3'
```

ERG

Sequenzdaten des Gegenstranges mit dem Primer *E2 – nichtcodierender Strang

ERG

```
5' TGGTGCTTCC CAGGTGATGC AGCTGGAGTT GGAGCTGTCC GACAGGAGCT  
CCAGGAGGAA CTGCCAAAGC TGGATCTGGC CACTGCCTGG ATTTGCAAGG  
CGGCTACTTG TTGGTCCAAG AATCTGATAA GGATCTAACT GAGGACGCTG  
GTCTTCAGTT TTGGGCACTG TGGAAGGAGA TGGTTGAGCA GCTTTGACT  
GGGGCGTGGG GTGGCCGTGA CCGGTCCAGG CTGATCTCCT GGGGGGCTCA  
TATGGTAAAT CACCAAATTT ATTGAAGCCA CCACGGTCAC TTCCGCCCAT  
GCCACCTCTG CCTCCACGGC CACCTCCACG ACCTCTGGGT TCATAGCCAC 3'
```

FUS

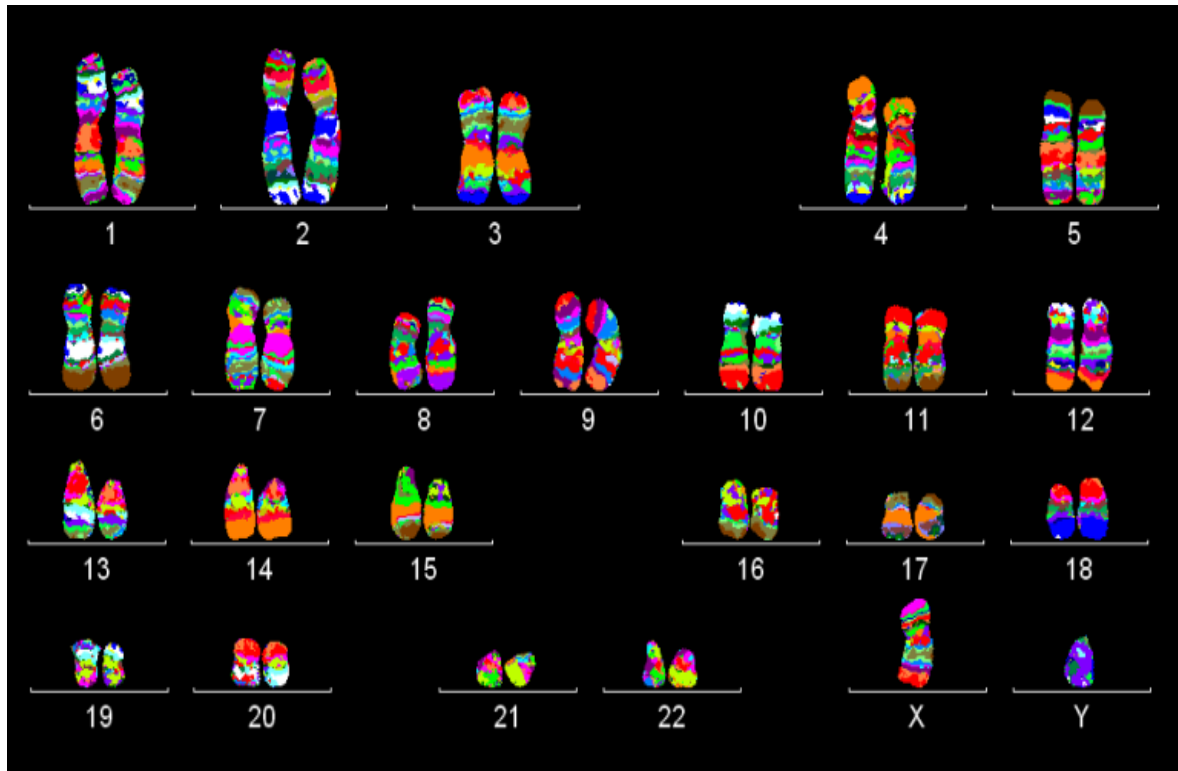
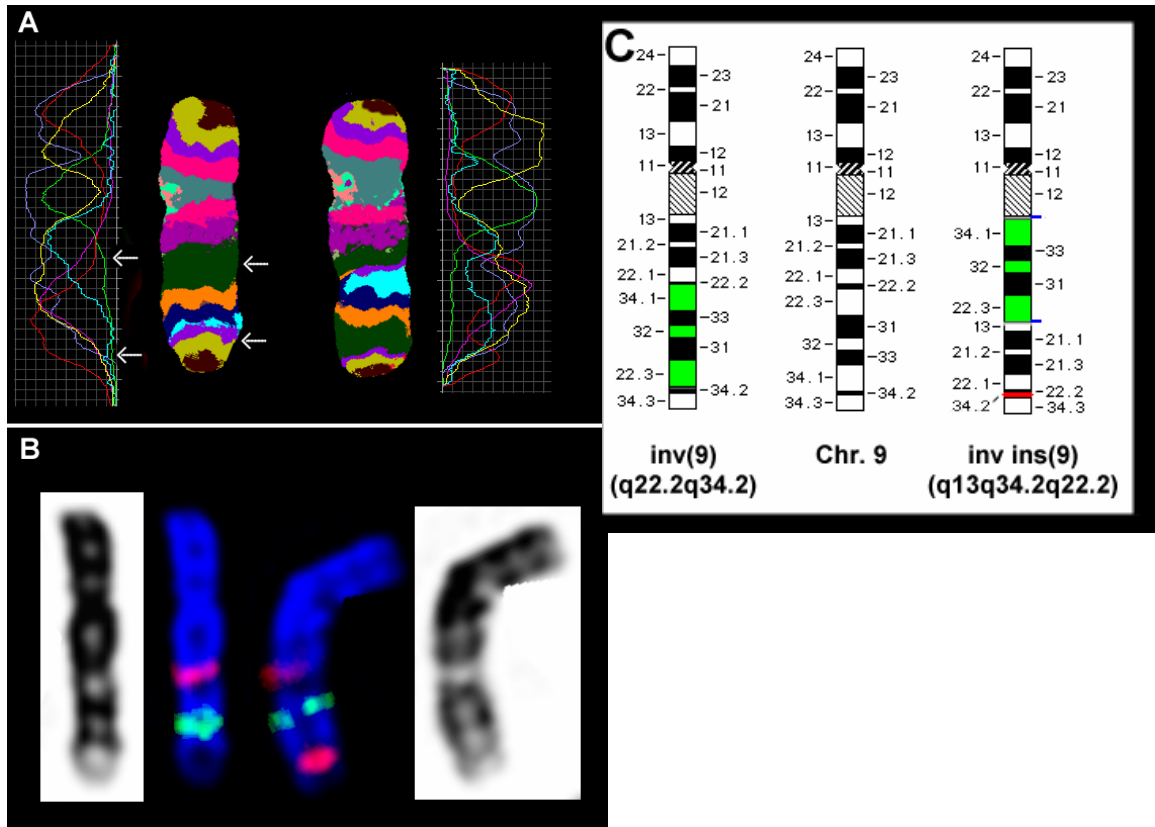


Abb. 8.3

Unauffälliger männlicher Karyotyp nach mMCB

Die Falschfarb-Bänderung aller Chromosomen ist dargestellt.

Die Abbildung wurde freundlicherweise von Anja Weise zur Verfügung gestellt.

**Abb. 8.4****Nachweis einer inv(9) mittels MCB und lokusspezifischen Sonden (Fall 17)**

Das derivative Chromosom ist jeweils in der rechten Bildhälfte abgebildet.

(A) MCB #9, in der Mitte sind die Chromosomen in den Falschfarben dargestellt, die von den entsprechenden Fluorochromprofilen flankiert werden. Die Pfeile markieren jeweils die Bruchstellen.

(B) Hybridisierungssignale der YAC-Sonden 945f5 (9q22.2) (rot dargestellt) und 933c05 (9q32) (in grün dargestellt). Im derivativen Chromosom deutlich ein Splitting des roten Signales zu erkennen. Der Karyotyp lautet: inv(9)(q22.2q34.2).

(C) Anhand der Ideogramme sind die möglichen Aberrationsmuster skizziert. In der Mitte das normale Chromosom 9, links das resultierende Bild beim Vorliegen einer Inversion, rechts die Bandenabfolge bei einer invertierten Insertion.

Tabelle 8.1**YAC-Sonden für Chromosom 13, die zu 5 DNA-Pools (I-V) zusammengefaßt wurden****Die Zahlen in den 5 Säulen zeigen die relativen DNA-Konzentrationen, die in den entsprechenden Pools zusammengemischt wurden, um so eine annähernde Gaußsche Verteilung zu erzielen.**

Sonde	DNA-Pools					Sonde	DNA-Pools				
	I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V
YAC 841a05	100	50				YAC 945a10			44	64	
YAC 768a04	88	54				YAC 744f11			39	67	
YAC 943e04	80	58				YAC 854b07			34	70	
YAC 931f04	72	62				YAC 940b09			28	73	
YAC 939b04	64	66				YAC 930c05			22	76	4
YAC 895f08	56	70	6			YAC 814h11			16	79	8
YAC 939b04	48	74	10			YAC 843c03			11	82	12
YAC 877d05	40	78	14			YAC 911g04			6	85	16
YAC 748e04	32	82	17			YAC 835f12			3	88	20
YAC 951a03	24	86	21			YAC 750h05				91	24
YAC 963h11	16	90	25			YAC 792a09				94	28
YAC 818b12	8	94	28			YAC 852g02				97	32
YAC 911f06		100	32			YAC 968g12				100	36
YAC 984g06		94	35			YAC 841f03				96	40
YAC 761d09		88	39			YAC 758c09				91	45
YAC 940g04		82	42			YAC 921f02				86	50
YAC 933e09		76	46			YAC 804a04				82	55
YAC 954c12		70	49			YAC 854b05				77	60
YAC 818f11		64	52			YAC 961h10				73	65
YAC 843e11		58	56			YAC 838c01				68	70
YAC 955g07		52	59			YAC iD01116				64	75
YAC 843e09		46	63			YAC 871e09				59	80
YAC 923e02		40	66	3		YAC 811h06				55	85
YAC 784g06		34	69	7		YAC 847e10				51	90
YAC 693e02		28	73	10		YAC 909g03				46	95
YAC 937c07		22	76	13		YAC 911d04				42	100
YAC 745e03		16	79	16		YAC 839b05				37	97
YAC 935g02		10	82	19		YAC 737f10				33	94
YAC 418c06		4	86	22		YAC 795a03	3			28	91
YAC 806f06			89	25		YAC 927c11	7			24	88
YAC 936b06			93	28		YAC 761g06	14			19	85
YAC 906a04			96	31		YAC 947e06	21			15	82
YAC 802g08			100	34		YAC 935g10	28			11	79
YAC iB09121			93	37		YAC 943g06	35			7	76
YAC iE02154			87	40		YAC 842g06	42			3	72
YAC 845c10			81	43		YAC 775f11	49				68
YAC 876f02			76	46		YAC 846f05	56				65
YAC 759h05			70	49		YAC 857b04	63				62
YAC 790d02			65	52		YAC 743d08	70				60
YAC 801b11			60	55		YAC 950d10	77				59
YAC 908b01			54	58		YAC 794g05	88				55
YAC 758b01			49	61		YAC 935g10	100				50

Tabelle 8.2
YAC-Sonden für Chromosom 13, die zu 7 DNA-Pools (a-g) zusammengefaßt wurden

Sonde	Lokalisation	DNA-Pools	Sonde	Lokalisation	DNA-Pools
YAC 841a05	13q12	a	YAC 945a10	13q21-22	cd
YAC 768a04	13q12	a	YAC 744f11	13q21-22	cd
YAC 943e04	13q12	a	YAC 854b07	13q21-22	cd
YAC 931f04	13q12	a	YAC 940b09	13q21-22	cd
YAC 939b04	13q12	a	YAC 930c05	13q22	de
YAC 895f08	13q12-13	a	YAC 814h11	13q22	de
YAC 939b04	13q12-13	a	YAC 843c03	13q22	de
YAC 877d05	13q12-13	ab	YAC 911g04	13q22	de
YAC 748e04	13q12.3-13	ab	YAC 835f12	13q22	de
YAC 951a03	13q13	ab	YAC 750h05	13q22	de
YAC 963h11	13q13	ab	YAC 792a09	13q22	de
YAC 818b12	13q13-14.1	b	YAC 852g02	13q22	de
YAC 911f06	13q14	b	YAC 968g12	13q22-31	de
YAC 984g06	13q14	b	YAC 841f03	13q22-31	de
YAC 761d09	13q14	b	YAC 758c09	13q22-31	de
YAC 940g04	13q14	b	YAC 921f02	13q22-31	de
YAC 933e09	13q14	b	YAC 804a04	13q31	de
YAC 954c12	13q14	b	YAC 854b05	13q31	de
YAC 818f11	13q14	b	YAC 961h10	13q31	de
YAC 843e11	13q14	b	YAC 838c01	13q31	de
YAC 955g07	13q14	b	YAC iD01116	13q31	de
YAC 843e09	13q14.2-14.3	bc	YAC 871e09	13q31-32	e
YAC 923e02	13q14-21	bc	YAC 811h06	13q31-32	e
YAC 784g06	13q14-21	bc	YAC 847e10	13q31-32	e
YAC 693e02	13q14-21	bc	YAC 909g03	13q32	ef
YAC 937c07	13q14-21	bc	YAC 911d04	13q32	ef
YAC 745e03	13q14-21	bc	YAC 839b05	13q32	ef
YAC 935g02	13q14-21	bc	YAC 737f10	13q32	ef
YAC 418c06	13q14-21	bc	YAC 795a03	13q32	ef
YAC 806f06	13q14-21	bc	YAC 927c11	13q32	ef
YAC 936b06	13q14.3-21.1	bc	YAC 761g06	13q32-33	efg
YAC 906a04	13q21.1-21.2	bc	YAC 947e06	13q32-33	efg
YAC 802g08	13q21.1-21.2	bc	YAC 935g10	13q32-33	efg
YAC iB09121	13q21	bc	YAC 943g06	13q33-34	fg
YAC iE02154	13q21	bc	YAC 842g06	13q33-34	fg
YAC 845c10	13q21	bc	YAC 775f11	13q33-34	fg
YAC 876f02	13q21	bc	YAC 846f05	13q33-34	fg
YAC 759h05	13q21	bc	YAC 857b04	13q33-34	fg
YAC 790d02	13q21.1-21.2	bcd	YAC 743d08	13q33-34	fg
YAC 801b11	13q21.1-21.2	bcd	YAC 950d10	13q33-34	fg
YAC 908b01	13q21.2-21.3	bcd	YAC 794g05	13q33-34	fg
YAC 758b01	13q21.2-21.3	bcd	YAC 935g10	13q34	fg

Tabelle 8.3
YAC-Sonden für Chromosom 13, die zu 6 DNA-Pools (A-F) zusammengefaßt wurden

Sonde	Lokalisation	DNA-Pools	Sonde	Lokalisation	DNA-Pools
YAC 841a05	13q12	A	YAC 945a10	13q21-22	C
YAC 768a04	13q12	A	YAC 744f11	13q21-22	C
YAC 943e04	13q12	A	YAC 854b07	13q21-22	C
YAC 931f04	13q12	A	YAC 940b09	13q21-22	C
YAC 939b04	13q12	A	YAC 930c05	13q22	CD
YAC 895f08	13q12-13	A	YAC 814h11	13q22	CD
YAC 939b04	13q12-13	A	YAC 843c03	13q22	CD
YAC 877d05	13q12-13	A	YAC 911g04	13q22	CD
YAC 748e04	13q12.3-13	A	YAC 835f12	13q22	CD
YAC 951a03	13q13	AB	YAC 750h05	13q22	CD
YAC 963h11	13q13	AB	YAC 792a09	13q22	CD
YAC 818b12	13q13-14.1	B	YAC 852g02	13q22	CD
YAC 911f06	13q14	B	YAC 968g12	13q22-31	DE
YAC 984g06	13q14	B	YAC 841f03	13q22-31	DE
YAC 761d09	13q14	B	YAC 758c09	13q22-31	DE
YAC 940g04	13q14	B	YAC 921f02	13q22-31	DE
YAC 933e09	13q14	B	YAC 804a04	13q31	DE
YAC 954c12	13q14	B	YAC 854b05	13q31	DE
YAC 818f11	13q14	B	YAC 961h10	13q31	DE
YAC 843e11	13q14	B	YAC 838c01	13q31	DE
YAC 955g07	13q14	B	YAC iD01116	13q31	DE
YAC 843e09	13q14.2-14.3	B	YAC 871e09	13q31-32	EF
YAC 923e02	13q14-21	B	YAC 811h06	13q31-32	EF
YAC 784g06	13q14-21	B	YAC 847e10	13q31-32	EF
YAC 693e02	13q14-21	B	YAC 909g03	13q32	EF
YAC 937c07	13q14-21	B	YAC 911d04	13q32	EF
YAC 745e03	13q14-21	B	YAC 839b05	13q32	EF
YAC 935g02	13q14-21	B	YAC 737f10	13q32	EF
YAC 418c06	13q14-21	B	YAC 795a03	13q32	EF
YAC 806f06	13q14-21	BC	YAC 927c11	13q32	EF
YAC 936b06	13q14.3-21.1	BC	YAC 761g06	13q32-33	EF
YAC 906a04	13q21.1-21.2	C	YAC 947e06	13q32-33	EF
YAC 802g08	13q21.1-21.2	C	YAC 935g10	13q32-33	EF
YAC iB09121	13q21	C	YAC 943g06	13q33-34	EF
YAC iE02154	13q21	C	YAC 842g06	13q33-34	EF
YAC 845c10	13q21	C	YAC 775f11	13q33-34	EF
YAC 876f02	13q21	C	YAC 846f05	13q33-34	EF
YAC 759h05	13q21	C	YAC 857b04	13q33-34	EF
YAC 790d02	13q21.1-21.2	C	YAC 743d08	13q33-34	EF
YAC 801b11	13q21.1-21.2	C	YAC 950d10	13q33-34	EF
YAC 908b01	13q21.2-21.3	C	YAC 794g05	13q33-34	EF
YAC 758b01	13q21.2-21.3	C	YAC 935g10	13q34	EF

Tabelle 8.4
Fälle mit YAC-MCB Chromosom 13 untersucht

Fall	Untersuchtes Material	Klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Molekularzytogenetischer Befund nach YAC-MCB #13	Anmerkungen
Fälle mit konstitutionellen Aberrationen						
1	Lymphozyten	Partnerin mit 2x Abortus	30	46,XY,der(13;14)(q10;q10)	ish t(13;14)(p11.1;p11.1)	
2	Lymphozyten	Elternuntersuchung, da bei Kind t(13;14) nachgewiesen wurde	60	46,XX,der(13;14)(q10;q10)	ish t(13;14)(p11.1;p11.1)	
3 ^{a)}	Lymphozyten	Auffällige Facies und Micrognathie, Mamil- len auseinanderste- hend, relativ großer Kopf, kurzer Hals, Lidödeme, Ödeme am Fußrücken	1 Monat	46,XX,t(5;13)(q13;q?14)	ish t(5;13)(q13;q14)	YAC-MCB #13 simultan mit MCB #5 hybri- disiert; Abb. 3.4
4	Lymphozyten	Auffälliges Ergebnis im Triple-Test mit anschließender FW- Punktion, Überprü- fung der Bruchpunkte an Lymphozyten	1 Monat	46,XX,t(12;13)(q13;q22)	ish t(12;13)(q13;q22)	
5	Lymphozyten	Schwere komplexe Behinderung, weitere Abklärung einer partiellen Triso- mie 13	8	46,XX,der(9)t(9;13)(p23;q21.??)	ish der(9)t(9;13)(p22;q21.2)	MCB #9 zu- sätzlich hybridi- siert

Fortsetzung Tabelle 8.4

Fall	Untersuchtes Material	Klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Molekularzytogenetischer Befund nach YAC-MCB #13	Anmerkungen
6	Lymphozyten	Vater von Fall 5 als Träger der balancierten t(9;13)	37	46,XY,t(9;13)(p22.2;q21.2)	ish t(9;13)(p22;q21.2)	MCB #9 zusätzlich hybridisiert
Fälle mit tumorspezifischen Aberrationen						
7	Knochenmark	Panzytopenie unklarer Genese	73	45,XX,del(3)(p21),-5[6]/47,XX,del(3)(p21),-4,-5,-7,+8,+13,+14,-18,-19,+3mar[4]	ish +13	
8	Knochenmark	Plasmazell-Leukämie	72	Komplex, u.a. -13	ish -13	
9	Knochenmark	V. a. akute Leukämie	65	46,XX,del(13)	ish del(13)(q13q22)	
10 ^{b)}	Knochenmark	Akute Leukämie	Keine Angabe	46,XY,del(13)(q?q?)	ish del(13)(q13q31.3)	Chromosome-bar-code #13 eingesetzt; Abb. 3.5
11	Knochenmark	V. a. AML aus MDS	60	45,X,-Y,der(13)t(1;13)(q2?1;q34)[13]	ish der(13)t(1;13)(q21;q32)	MCB #1 zusätzlich hybridisiert
12	Knochenmark	AML M1	68	43,XX,t(3;6)(q?24;q?24),del(5)(q?15;qter),-7,-13,-16,-21,+r[17]/46,XX,t(3;6)(q?24;q?24),del(5)(q?15;qter)[3]	ish del(5)(q13q33);der(21;21)r(13;21;21)(::13q14.2→13q33.3::21p11→21q22.3::21p11→21q22.??::)	YAC-MCB #13 mit wcp #21 hybridisiert, MCB #5 zusätzlich hybridisiert; Abb. 3.3 B

a) Abbildung in Liehr *et al.*, 2002a

b) Liehr und Claussen, 2002a

Abkürzungen:

AML akute myeloische Leukämie
 AML M0-M7 FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien
 MDS Myelodysplastisches Syndrom
 V. a. Verdacht auf

Tabelle 8.5

Evaluierung der MCB-Methode durch andere Sonden bzw. molekularzytogenetische Techniken

Fall	Unter- suchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeit- punkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzyto- genetische Techniken bzw. Sonden	Molekularzyto- genetischer Befund	Anmerkungen
Fälle mit konstitutionellen Aberrationen							
13 ^{a)}	Amnionzellen und Lympho- zyten des Neu- geborenen	Intrauterine Wachstums- retardierung; Postnatal: multiple cranio- faciale Dysmorphien, Hand- anomalien, Pylorusstenose, Wachstumsretardierung, schwere mentale Retar- dierung	Pränatal in der 35. SSW, Lympho- zyten 5 Monate nach Geburt	46,XX,dup(9q)	- <i>Micro-CGH</i> - FISH mit folgenden Sonden: wcp9, pcp 9p, pcp 9q, Midi 18, 23, 36, YACs 747b3, 750c6, 906g6, 945f5, 806f02, 933c05, 957h08, 908f11, 933g6, 931d9, 857g10, 870b4 - MCB #9	<i>nach Micro-CGH:</i> rev ish enh(9q22-31) <i>nach FISH und MCB:</i> ish dup(9)(pter→q22.1: :q31.1→q22.1::q31.1→ q22.1::q31.1→qter)	Bruchpunktüber- spannende YAC- Sonden eingesetzt Abb. 3.8
14	Lymphozyten	Mentale Retardierung, keine morphologischen Auffällig- keiten	18	46,XY,der(5)	- FISH mit folgenden Sonden: rpcp 5p13-10, rpcp 5q10-13, Midi 12, cenBACs 301A5, 160F8 - MCB #5	ish dup(5)(pter→ q11.1::p12→qter)	
15	Amnionzellen	Altersindikation	36	46,XY,?del(8) (q12 or q21.1) or ?ins(8)	- FISH mit folgenden Sonden: BACs 688B7, 366K18, 382J12, 697L23, 51M18, 353O11 + cep8 - MCB#8	ish del(8)(q13.3 or 21.11q21.2)	

Fortsetzung Tabelle 8.5

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzytogenetische Techniken bzw. Sonden	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
16	Lymphozyten	In Amnionzellen der Patientin (Punktion wegen auffälligem Triple-Test) lag ebenfalls der(5) vor	31	46,XX,?inv(5) (q33.2 or q33.3 q35.2 or 35.3) or ?ins(5)(pter→q33.1::q34→q35.3::q33.2→q34::q35.3→qter)	- FISH mit folgenden Sonden: YACs 827e4, 782b10, subtel 5q, rpcp 5q34-qter - MCB #5	ish inv(5)(q33.??q35.3)	
17	Lymphozyten	Geplante ICSI da unerfüllter Kinderwunsch	26	46,XX,?inv(9) (q22.2q34.2) or ?ins(9) (q13q34.2q22.2)	- FISH mit folgenden Sonden: YACs 933c05, 945f5 - MCB #9	ish inv(9)(q22.2q34.2)	Bruchpunktüberspannende YAC-Sonde eingesetzt Abb. 8.4
18	Lymphozyten	Sterilität	43	46,XY,t(9;17) (q?13;p?11.2), 16qh+	- subcen-Mix #17 (cenBACs 746M1, 229K15, pcg 17p, pcg 17q, cep 17) - MCB # 9, #16, #17	ish t(9;17)(9pter→9q13::17p11.1 or 11.2→17pter;17qter→17p11.1 or 11.2::9q13→9qter),16qh+	
19	Amnionzellen	Altersindikation	35	46,XX,t(3;13) (q13;q22)mat	- FISH mit folgender Sonde: YAC-Contig #13 (q22-31) - MCB #3	ish t(3;13)(q13;q22)	
20	Lymphozyten	Mutter von Fall 19 als Träger einer konstitutionellen t(3;13)	35	46,XX,t(3;13) (q13;q22)	- FISH mit folgender Sonde: YAC-Contig #13 (q22-31) - MCB #3	ish t(3;13)(q13;q22)	
21 ^{b)}	Lymphozyten	Entwicklungsverzögerung, Kleinwuchs, Blepharophimose, Klinodaktylie, hypoplastisches Philtrum, Mikrocephalus	2	46,XY,add(13) (p1?1.2)	- FISH mit folgenden Sonden: M-FISH, acro-cenM-FISH, pcg 6p, subtel 6p (62111) - Mikrosezierung - MCB #6	ish der(13)t(6;13)(6pter→6p22.2::13p11.2→13qter)	Abb. 3.9

Fortsetzung Tabelle 8.5

Fall	Unter- suchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeit- punkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzyto- genetische Techniken bzw. Sonden	Molekularzyto- genetischer Befund	Anmerkungen
22 ^{c)}	Lymphozyten	Postaxiale Polydaktylie bei- der Hände und an einem Fuß, Krampfanfälle, schwere geistige Entwicklungsverzögerung, Mikrocephalus, Pachygyrie	3	48,XX,+2mar	- FISH mit folgenden Sonden: cenM-FISH mit midi 54, cep 15 (α -Satel- lit und Satellit-III-Sonde) (ABBOTT), lokusspezifi- sche Sonden: <i>SNRPN</i> und D15S10 (15q13) (ABBOTT) - MCB #15	ish + idic(15)(pter→q13: :q13→pter)x2	Abb. 3.10
Fälle mit tumorspezifischen Aberrationen							
23	Knochenmark	JMML	2	46,XX,add(7)(q36) [16]	- Mikro-CGH - MCB #3	ish der(7)t(3;7) (q11.1;q32)	Fall 24 gleiche Patientin
24	Knochenmark	JMML mit Übergang in AML M6	3	46,XX,add(7)(q36) [16]/ 46,XX,del(7)(q32), add(18)(p11.3)[15]	- Mikro-CGH - MCB #3 #18	<u>Klon 1:</u> ish der(7)t(3;7) (q11.1;q32) <u>Klon 2:</u> ish del(7)(q32), der(18)t(3;18) (q21;p11.3)	
25 ^{d)}	Knochenmark	CML	48	47,XY+mar[18]/ 46,XY[2]	- Mikrosezierung - Mikro-CGH - MCB #11	ish r(11)(::p11.2→ q13.1::q14::)	Abb. 3.11

Fortsetzung Tabelle 8.5

Fall	Unter- suchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (<i>in Jahren</i>) (zum Zeit- punkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzyto- genetische Techniken bzw. Sonden	Molekularzytogenetischer Befund
26 ^{e)}	Knochenmark	AML	63	nach GTG und M-FISH: 40~44,XY,-1,+der(1)t(1;8;20),-2, +del(2),-3,+der(3)t(3;6),-5,+der(5) t(5;18),-6,+del(6),-8,-9,-10,+der(10) t(3;10),-14,-15,-16,-17,+del(17),-18, +der(18)t(8;18;5;2;20),-20,+der(20) t(15;17;20),+der(20)t(1;20;18)[cp6]/ 46,XY[2]	- Mikrosezierung - M-FISH - MCB #1 #2 #5 #8 #18 #20	ish 40~44,XY,der(1)t(1;5;8;20)(1qter→1p12: :5q14.3→5q15 or 5q15→5q14.3::8p11.2→ 8p23.73::20p11.1→20p13),del(2)(q12),der(3) t(3;6),der(5)t(5;18)(5p15.33→5q11::18q21.3→ 18q23),del(6),-8,der(9)t(9;17;15),der(10)t(3;10), del(11)(q24),-15,-16,del(17),der(18) t(8;18;5;2;20)(8q24.3→8q24.2 or 8q24.2→ 8q24.3::18p11.22→18q21.3::5q14.3→5q11: :2q32→2q12::20q13.2→20q13.33),der(20) t(1;20;18)(1p36.33→1p31.3-22.3::20p11.1→ 20q11.2 or 20q11.2→20p11.1::18p11.22→ 18p11.32) Abb. 3.12 A + B
27 ^{f)}	Knochenmark	Primäres Plasmozytom mit Übergang in Plasmazell- leukämie	72	nach GTG: 51,XY,-1,der(?)t(1;?)(q?2;?),+3,+5, +der(7)t(1;7)(p2?1;p2?1),+8,der(11) add11(p?15)add11(q25),del(13) (q22),add(14)(p?13),+15,+19[cp3]/ 53,XY,ins(1;?)(p21;?),+3,+5,+7,+14, +15,+mar[cp2] nach CGH: rev ish enh(3,7,8,9,15,19p), dim(1p31.1p10,13,14q21q31), amp(1q12q44,5p15.3q14,11q14q25, Xq21.3q28)	- Mikro-CGH - M-FISH - lokus- spezifische Sonden - MCB #1, #3, #5, #7, #8, #9, #10, #11, #13, #14, #15, #17, #19, #X	ish 51,XY,-1,-1,+3,+der(5)t(5;11;1)(5pter→ 5q13-q14::11q24→11q25::1q12→1qter),+7 or +der(7)t(7;1)(7qter→7p15::1p31.1→1pter),+8,+ der(9)t(1;9)(1qter→1q12::9q12→9pter), der(11)t(1;11;1)(1pter→1p31.1::11p15.5→ 11q25::1q12→1qter),-13,der(14)t(X;14)(Xqter→ Xq21.3::14pter→14qter),+15,+18,der(19) t(9;19)(9qter→9q12::19q11→19pter),+i(19) (q10) Abb. 3.13

a) Fall wurde publiziert in Heller *et al.*, 2000ab) Fall wurde publiziert in Trifonov *et al.*, 2003c) Fall wurde publiziert in Nietzel *et al.*, 2003d) Fall wurde publiziert in Starke *et al.*, 2001e) Fall wurde publiziert in Heller *et al.*, 2003f) Fall wurde publiziert in Heller *et al.*, - *in press-c*

Abkürzungen:

AML	akute myeloische Leukämie
AML M0-M7	FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien
CML	chronisch myeloische Leukämie
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
SSW	Schwangerschaftswoche

Tabelle 8.6

Mit MCB-Sonden untersuchte Fälle, bei denen die Bruchpunkte der GTG-Bänderung bestätigt wurden

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (<i>in Jahren</i>) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund
Fälle mit konstitutionellen Aberrationen						
28	Lymphozyten	Psychomotorische Retardierung, fragliche Neurodegeneration, craniofaciale Dysmorphien	12	46,XX,t(1;14)(q24;q13)	#1 #14	ish t(1;14)(q24;q13)
29	Amnionzellen	Altersindikation	41	46,XX,t(2;17)(?q13;q23) <i>de-novo</i>	#2 #17	ish t(2;17)(q13;q23)
30	Lymphozyten	Geplante ICSI	26	46,XX,inv(3)(p13q21)mat	#3	ish inv(3)(p13q21) ⇒ perizentrische Inversion
31	Lymphozyten	Mehrere Aborte	32	46,XX,?inv(5)(p?13p?15.1)	#5	ish inv(5)(p13p15.1) ⇒ parazentrische Inversion
32	Lymphozyten	Erhebliche geistige Behinderung	26	46,XX,?inv(18)(q11.2q23)pat	#18	ish inv(18)(q11.2q23) ⇒ parazentrische Inversion Abb. 3.18
33	Lymphozyten	Vater von Fall 32 als Träger einer konstitutionellen inv(18)	62	46,XY,inv(18)(q11.2q23)	#18	ish inv(18)(q11.2q23) ⇒ parazentrische Inversion Abb. 3.18
34	Chorionzotten	Auffälliger Ultraschallbefund	36	47,XX,+?iso(12p)	#12	ish +i(12) (pter→p10::p10→pter)
Fälle mit tumorspezifischen Aberrationen						
35	Knochenmark	AML M5	26	46,XX,inv(1)(q11q31), t(9;11)(p22;q23)[8]	#1	ish inv(1)(q11q31)
36	Knochenmark	Akute Leukämie (AML?)	46	46,XY,der(5)t(1;5) (p11;q34)[19]/46,XY[1]	#1 #5	ish der(5)t(1;5)(p11;q34)

Fortsetzung Tabelle 8.6

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund
37	Knochenmark	MDS-RAEB	33	46,XX,inv(3)(q21q26)[9]/ 46,XX[1]	#3	ish inv(3)(q21q26)
38	Knochenmark	AML	70	45,XX,inv(3)(q21q26),-7[8]/ 45,XX,?inv(3)(q21q26),-7[2]	#3	ish inv(3)(q21q26)
39	Knochenmark	AML	81	46,XX,del(5)(q14q34)[cp2]/ 46,XX[7]	#5	ish del(5)(q14q34)
40	Knochenmark	AML	79	46,XX,t(4;5)(p?12;q?11.2)[4]/ 46,XX[16]	#5	ish t(4;5)(p12;q11.2)
41	Knochenmark	AML M1	k.A.	46,XX,-7[23]/46,XX[23]	#7	ish -7
42	Knochenmark	AML	55	46,XY,del(7)(q3?3), inv(16)(p13q22)[10]	#7	ish del(7)(q33)
43	Knochenmark	T-ALL	26	46,XY,t(10;11)(p12;q21)[3]/ 46,XY[17]	#11	ish t(10;11)(p12;q21)
44	Knochenmark	AML M4eo	41	46,XY,t(16;16)(p13;q22)[29]/ 46,XX[1]	#16	ish t(16;16)(p13;q22)
45	Knochenmark	AML M4eo	k.A.	46,XY,t(16;16)(p13;q22)[20]	#16	ish t(16;16)(p13;q22)
46	Knochenmark	AML	k.A.	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]/ 46,XY[5]	#16	ish inv(16)(p13q22)
47	Knochenmark	T-ALL	58	46,XY,del(16)(q2?3)[4]/ 46,XY[6]	#16	ish del(16)(q23)
48	Knochenmark	c-ALL	22	46,XY,t(16;21)(p?11;q?22)[17]/ 46,XY[4]	#16 #21	ish t(16;21)(p11;q22) Abb. 3.25

Abkürzungen:

AML
AML M0-M7
c-ALL
ICSI

akute myeloische Leukämie
FAB-Klassifikation der akuten
myeloischen Leukämien
common-akute lymphatische
Leukämie
Intracytoplasmatische
Spermieninjektion

k.A.
MDS
RAEB
T-ALL
V. a.

keine Angaben verfügbar
Myelodysplastisches Syndrom
refraktäre Anämie mit
Blastenexzeß
T-Zell akute lymphatische
Leukämie
Verdacht auf

Tabelle 8.7

Mit molekularzytogenetischen Methoden untersuchte Fälle, bei denen die Bruchpunkte der GTG-Bänderung korrigiert wurden bzw. eine Bruchpunktcharakterisierung erst nach MCB möglich wurde

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
Fälle mit konstitutionellen Aberrationen							
49	Lymphozyten	habituelle Aborte (3)	29	46,XX,t(1;2)(p36.1~36.3;q33)	#1 #2	ish t(1;2)(p36.1;q33)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
50	Amnionzellen	Altersindikation	39	46,XY,t(3;8)(q23;p21) <i>de-novo</i>	#3 #8	ish t(3;8)(q25;p23.1)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
51	Amnionzellen	Altersindikation	38	46,XX,t(11;22)(q24/25;q13.1) <i>de-novo</i>	#11 wcp #22	ish t(11;22)(q23.??1;q11.2)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
52 ^{a)}	Lymphozyten	Elternuntersuchung, beim Kind unbalancierte Translokation nachgewiesen	33	46,XY,t(1;17)(q44;p12), 21pstk+	#17	ish t(1;17)(q44;p13.3 or 13.2)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
53	Amnionzellen	Gründe für Pränataldiagnostik nicht bekannt	21	46,XY,inv(1)(p?31.1;q?25)mat	#1	ish inv(1)(p32.3q32.1) ⇒ perizentrische Inversion	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
54	Lymphozyten	Mutter von Fall 53 als Träger der konstitutionellen inv(1)	21	46,XX,inv(1)(p?31.1;q?25)	#1	ish inv(1)(p32.3q32.1) ⇒ perizentrische Inversion	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
55	Lymphozyten	Geplante ICSI, da Oligozoospermie	39	46,XY,der(1p)	#1	ish inv(1)(p34.2p31.3) ⇒ parazentrische Inversion	erst nach MCB Bruchpunkt-Beschreibung möglich
56	Lymphozyten	Keine Angaben verfügbar		46,XX,der(1),inv(8)	#1 #8	ish dup(1)(p31.3p31.2) , inv(8)(q21.3q24.2)mat ⇒ parazentrische Inversion	erst nach MCB Bruchpunkt-Beschreibung möglich
57	Lymphozyten	Mutter von Fall 56 als Träger der konstitutionellen inv(8)	k.A.	46,XX,inv(8)	#1 #8	ish inv(8)(q21.3q24.2) ⇒ parazentrische Inversion # 1 unauffällig	erst nach MCB Bruchpunkt-Beschreibung möglich

Fortsetzung Tabelle 8.7

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
58	Lymphozyten	Frühgeburt 31. SSW; Gaumenspalte, tiefer Ohransatz und dysplastische Ohrmuschel, Ventrikelseptumdefekt	1 Monat	46,XX,inv(3)	#3	ish inv(3)(p11.2p23) ⇒ parazentrische Inversion	erst nach MCB Bruchpunkt-Beschreibung möglich, Mutter oB
59	Lymphozyten	Habituelle Aborte (3)	38	46,XX,der(11)?inv(11)(q21q24.1)	#11	ish inv(11)(q21q23.3) ⇒ parazentrische Inversion	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
60	Lymphozyten	V.a. Kallmann-Syndrom; Hodendystrophie beidseitig, Gynäkomastie, kein Hochwuchs	20	46,X,add(Y)(p11.3)pat	#Y	ish inv(Y)(p11.32q11.2?23)pat ⇒ perizentrische Inversion	erst nach MCB Beschreibung möglich, Bruder: Fall 61 Vater: Fall 62
61	Lymphozyten	V.a. Kallmann-Syndrom; Hypogonitalismus	13	46,X,add(Y)(p11.3)pat	#Y	ish inv(Y)(p11.32q11.2?23)pat ⇒ perizentrische Inversion	erst nach MCB Beschreibung möglich, Bruder: Fall 60 Vater: Fall 62
62	Lymphozyten	Elternuntersuchung, da bei beiden Söhnen inv(Y) nachgewiesen, es stehen keine klinischen Angaben des Vaters zur Verfügung	43	46,X,add(Y)(p11.3)	#Y	ish inv(Y)(p11.32q11.2?23) ⇒ perizentrische Inversion	erst nach MCB Beschreibung möglich, Söhne: Fälle 60 und 61
63	Fibroblasten aus Abortgewebe	Abortus	k.A.	46,XY,der(1)	#1	ish dup(1)(pter→p22.2::p22.2→p33::p22.2→qter) ⇒ duplizierter Bereich liegt invertiert vor	erst nach MCB Beschreibung möglich, Partnerin von Fall 68
64	Lymphozyten	Keine Angaben verfügbar		?dup(1q)	#1	ish dup(1)(q44)	erst nach MCB Bruchpunkt-Beschreibung möglich

Fortsetzung Tabelle 8.7

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
65	Lymphozyten	Mikrocephalus, Progenie, erweitertes Ventrikelsystem, hypertrophes Genitale, deutlicher psychomotorischer Entwicklungsrückstand	16	46,XY,dup(10)(q23q24)	#10	ish dup(10)(q23.3q24.3)	Bruchpunktpräzisierung erfolgt, dup(10) im Labor von Prof. Wieacker durch CGH bestätigt, Eltern oB
66	Lymphozyten	Schwere mentale Retardierung, craniofaciale Dysmorphien, Epilepsie, Hepatopathie und andere Merkmale des Pallister-Kilian-Syndroms	13	46,XX,der(12)t(12;12)(q24.3;p11)	#12	ish dup(12)(pter→q24.3:p11.2→pter)	Bruchpunktpräzisierung erfolgt, enh(12)(p10-pter) im Labor von Prof. Wieacker durch CGH bestätigt
67	Lymphozyten	V.a. Prader-Willi/Angelman-Syndrom	10	46,XX,der(18)	#18	ish dup(18)(q21)	erst nach MCB Beschreibung möglich
Fälle mit konstitutionellen Aberrationen– komplex aberrant							
68	Lymphozyten	Elternuntersuchung, da im Abortgewebe dup(1) nachgewiesen (= Fall 63)	43	46,XY,der(1)	#1	ish ins(1)(p31.2q31.2q32)	erst nach MCB Beschreibung möglich
69 ^{a)}	Amnionzellen	Altersindikation	39	46,XX,ins(1;4) <i>de-novo</i>	#1 #4	ish ins(1;4)(q31;q33q31.1) ⇒ inserierter Bereich liegt invertiert vor	erst nach MCB Bruchpunkt-Beschreibung möglich Abb. 3.19

Fortsetzung Tabelle 8.7

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzytogenetische Techniken und Sonden	Molekularzytogenetischer Befund
70	Lymphozyten	V. a. Turner-Syndrom bei Sterilität und Kleinwuchs (135 cm), es liegt keine mittelgradige oder schwere geistige Behinderung vor	38 Jahre	46,XX,-3,der(6)t(3;6)(q11;p25), der(15)t(3;15)(p11;q26), +mar[13]/ 45,XX,-3,der(6)t(3;6)(q11;p25), der(15)t(3;15)(p11;q26)[7]	- MCBs #3, #6, #15 - ceps 3, 6, 15 (ABBOTT) - subcen #3 (bA91A15, bA21I16, 3p, 3q, cep3) - subtel 3p (1186B18), 3q (196F4), 6p (62I11), 6q (57H4), subtel15q (D15S396, ABBOTT)	ish 46,XX,-3,+der(3)(:p12.1→q11.2:) (bA91A15+,bA21I16-), t(3;6)(3qter→3q13.2::3p13→3p12.1::3q13.2→3q12.1 or 3q12.1→3q13.2::6p25→6qter) (196F4+,bA21I16+, bA91A15-,62I11-,57H4+), t(3;15)(3pter→3p13::15q26→15pter)(1186B18+,bA91A15-, bA21I16-,D15S396-)[8]/ 45,XX,-3,t(3;6)(3qter→3q13.2::3p13→3p12.1::3q13.2→3q12.1 or 3q12.1→3q13.2::6p25→6qter) (196F4+,bA21I16+, bA91A15-,62I11-,57H4+), t(3;15)(3pter→3p13::15q26→15pter)(1186B18+,bA91A15-, bA21I16-,D15S396-)[6] Abb. 3.20
71^{b)}	Lymphozyten	nach Geburt: Microcephalus, faciale Dysmorphien und postaxiale Hexadactylie; Entwicklungsretardierung und Sprachentwicklungsstörung, Verhaltensauffälligkeiten, ausgeprägte Fettsucht	9 Monate; im Alter von 7 Jahren erneute Chromosomenpräparation	46,XX,t(2;4;11)(2qter→2p13:4q21→4qter;4pter→4q21:11p15→11pter;2pter→2p13:11p15→11qter)	- M-FISH - MCBs #1 #2 #4 #11	ish t(1;4;2;11)(1pter→1q43:11p14.1→11pter;4pter→4q21.1:1q43→1qter;2qter→2p12-13.1:4q21.1→4qter;11qter→11p14.1:2p12-p13.1→2pter) Abb. 3.21

Fortsetzung Tabelle 8.7

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzytogenetische Techniken und Sonden	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
Fälle mit tumorspezifischen Aberrationen							
72	Knochenmark	AML	46	46,XY,der(7)t(1;7)[3]/46,XY[7]	MCB #1 #7	ish dic(1;7)(pter→q10: :q10→qter)	Bruchpunkt- korrektur erfolgt
73	Knochenmark	AML	57	47,X,-X,del(3)(q?21q?25),+18, +mar[cp10]	MCB #3	ish t(3;3)(q21;q26)	Bruchpunkt- korrektur erfolgt
74	Knochenmark	Fanconi-Anämie	15	47,XY,+iso(3?)[28]/47,XY, der(1q),+iso(3?)[4]/46,XY[22]	MCB #3	ish +i(3)(qter→p10: :p10→qter)	Bruchpunkt- korrektur erfolgt
75	Knochenmark	MDS	k.A.	46~48,XX,der(3),-5,-20, +2mar[cp10]	MCB #3	Klon 1: ish del(3)(p11) Klon 2: ish del(3)(p11q24)	erst nach MCB Beschreibung möglich
76	Knochenmark	AML	67	46,XX,-4,-5,-11,-20,-21, +5mar [cp6]	MCB #5	ish del(5)(q11.2q34)	erst nach MCB Beschreibung möglich
77	Knochenmark	MDS-RAEB	66	46,XX,del(5)(q1?5)[7]/ 46~47,XX,+8[cp2]/46,XX[3]	MCB #5	ish del(5)(q14q33)	Bruchpunkt- korrektur erfolgt
78	Knochenmark	MDS	85	46,XX,del(5q)[6]/46,XX[11]	MCB #5	ish del(5)(q21q33)	erst nach MCB Beschreibung möglich
79	Knochenmark	MDS	k.A.	46,XX,del(5)(q1?3;q3?)[24]/ 46,XX[1]	MCB #5	ish del(5)(q15q34)	Bruchpunkt- korrektur erfolgt
80	Knochenmark	MDS	k.A.	46,XX,del(5)(q1?3;q3?3), del(20)(q?)[3]/45,XX,del(5), -7,del(20)(q?)[19]/46,XX[3]	MCB #5	ish del(5)(q13q32)	Bruchpunkt- korrektur erfolgt
81	Knochenmark	MDS	k.A.	46,XY,del(5)(q?)[14]	MCB #5	ish del(5)(q14.1)	erst nach MCB Beschreibung möglich
82	Knochenmark	MDS	68	46,XX,del(5)(q13q33),del(11) (?q22q24),del(13)(q12q14)[20]	MCB #5	ish del(5)(q14q34)	Bruchpunkt- korrektur erfolgt

Fortsetzung Tabelle 8.7

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzytogenetische Techniken und Sonden	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
83	Knochenmark	JMML	k.A.	46,XY,del(5)(q?)[21]/45,X,-Y,del(5)(q?)[1]/45,X-Y[2]/46,XY[1]	MCB #5	ish del(5)(q15)	erst nach MCB Beschreibung möglich
84	Knochenmark	AML M4	k.A.	46,XX;del(5)(q?12q?33),21q-[15]	MCB #5	ish del(5)(q15)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
85	Knochenmark	Akute Leukämie (AML?)	k.A.	48,XY,del(5)(q?),+8,+21[10]	MCB #5	ish del(5)(q15q33)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
86	Knochenmark	AML	k.A.	46,XY,t(5;12)(q2?1;q2?3)[12]	MCB #5 #12	ish t(5;12)(q22;q21)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
87	Knochenmark	T-ALL	k.A.	46,XY,inv(7)(p15or22q11or22)[15]	MCB #7	ish inv(7)(p21q21.3)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
88	Knochenmark	AML	55	46,XY,del(7q3?),inv(16)(p13q22)[10]	MCB #7	ish del(7)(q33)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
Fälle mit tumorspezifischen Aberrationen– komplex aberrant							
89	Knochenmark	AML M6	58	43-45,XY,der(3)?del(3)(q?2),-4,-5,del(7)(q31),-13,-14,-17,-20,add(20)(q1p1),-21,5-7mar,inc[cp8]	MCB #3 #5 #7	ish del(3)(q12q26.1),+der(?)t(3;?)(3qter→3q26.1::?),+der(5)t(5;?)(5q13::?),der(7)t(5;7)(7pter→7q31.1::5q33→5qter)	erst nach MCB Beschreibung möglich
90	Knochenmark	Akute Leukämie (AML?)	k.A.	45,XY,t(3;17)(q26;q21),del(12),-15[30]/ 46,XY[2]	- MCB #3 #5 #17 - M-FISH	ish 42~46,XY,t(1;2)(p36.??;p23),t(3;17)(q26.3;q12),del(12)(p?),der(13)t(5;13)(p12;p10)	erst nach MCB Beschreibung möglich
91	Knochenmark	AML	81	44~46,X,-Y,t(1;3)(p31;p14),-2,-4,?del(5)(q15),del(6)(q23),del(11)(q23),der(18)?t(18;?)(p11;?)-13,-15,-16,-18,+mar1-mar5[cp4]/46,XX[3]	MCB #5	ish del(5)(q12q33)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt

Fortsetzung Tabelle 8.7

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	Eingesetzte molekularzytogenetische Techniken und Sonden	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
92	Knochenmark	MDS-RAEBt	k.A.	46,XY,del(5)(q?)[12]/46,XY,del(5)(q?),-17,-18,+t(17;18)(q?;q?)[2]/46,XY,del(5)(q?),-7,-11,-13,-13,-15,-17,-18,+5,+7mar[3]/46,XY[8]	MCB #5	ish del(5)(q21q33)	erst nach MCB Beschreibung möglich
93 ^{c)}	Knochenmark	CML	78	46,XX,-5,-5,+del(5q),+der(5)	- MCB #5 - M-FISH	ish del(5)(pter→q12::q33→qter),ins(5)(pter→q15::q12→q21::q21→qter)	erst nach MCB Beschreibung möglich Abb. 3.22
94 ^{d)}	Knochenmark	AML-M2	22	43,XX,-5,?hsr(9)(p22),-16,add(17)(p12 or p13),-19[6]	- MCB #5 - M-FISH - ceps 5, 17 (ABBOTT)	Klon 1: ish 38-44,XX,-5,dic(5;17)(q11;p11),der(9)t(9;19)(p12;?),-16,der(16),-17,-19[cp9] Klon 2: ish 39-43,XX,-1,-5,dic(5;17)(q11;p11),-8,der(16)t(16;19),-17,-19[cp3]	erst nach MCB Beschreibung möglich
95	Knochenmark	AML M4	k.A.	46,XY,inv(16)(p13q22),der(18)t(11;18)(q21;q23)[12]	MCB #11 #16 #18	ish inv(16)(p13q22);der(18)t(11;18) (q23q21.3)	Bruchpunkt-korrektur erfolgt
96	Knochenmark	AML M2	k.A.	46,XY,del(12)(p?11p?13)[21]/46,XY,del(12),5q-,der(19)t(5;19),der(16)[1]/46,XY[3]	MCB #16	ish del(16)(p13.1)	erst nach MCB Beschreibung möglich

Fortsetzung Tabelle 8.7

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Befund nach M-FISH:	Eingesetzte molekularzytogenetische Techniken und Sonden	Molekularzytogenetischer Befund
97 ^{e)}	Knochenmark	Grunderkrankung: <i>de-novo</i> -TNF α -Rezeptor-1-assoziierte juvenile chronische Arthritis → t-MDS RAEB mit Übergang in t-AML M2	14	44,XY,-5,-6,der(7)t(6;7)(6pter→6p?11:7?p11→7?q11),der(12)t(13;12;13;12)(13qter→13q?13::12pter→12q?21:13q?→13q?:12q?→12qter),del(13)(q?),der(19)t(19;7;6;19)(19pter→19q13.??::7?→7?:6q?→6q?:19q13.??::19qter)[cp7]	- M-FISH - midi 54 - ceps 6, 7, 12, 13/21 - MCBs #5, #6, #7, #12, #13 #19	ish 44,XY,-5,der(6)t(6;7)(6pter→6q12:7p22.2→7pter or 7pter→7p22.2),dic(7;19)t(6;19;6;7;19;7;19)(19qter→19q12::7p13→7p11.1::19q12→19p12 or 19p12→19q12::7p11.1→7q21.3:6q12→6q26::19p13.3→19p12::6q26→6qter),dic(12;13)(13qter→13p11.2:12p13.1→12qter),ace(12;13)(13pter→13p11.2::12p13.1→12pter),-19 Abb. 3.23
98	Knochenmark	AML M4 (im Rezidiv)	14	40~46,XX,der(3)t(3;13;5),der(6)t(6;13),-8,der(9)(?9qh-),9qh+,der(12)t(?;12),-13,del(13),+der(17)t(12;17),-19,-22,-22[cp9]	- M-FISH - MCBs #1, #3, #5, #6, #9, #12, #13, #17 #X	ish der(3)t(3;13;12)(3qter→3p23::13q13→13q32::12q24.3),del(5)(5pter→5q34 or 35:),der(?)t(5;?)(5qter→5q35 or 34::?),der(6)t(?;3;6)(?:3p24::6p25→6qter),del(9)(9pter→9q11::9q21.2→9qter),9qh+,der(12)t(3;12)(3pter→3p24.3::12q12→12pter),del(13)(13pter→13q13:),der(?)t(?;13)(?:13q32→13q34 or 13q34→13q32),der(17)t(17;12;17)(17pter→17q25::24.3→12q12::17q25)

Die tumorzytogenetischen Fälle sind – bis auf wenige Ausnahmen – publiziert in Heller *et al.*, - *submitted*.

a) Abbildung in Liehr und Claussen, 2002

b) Fall wurde publiziert in Seidel *et al.*, 2003

c) Fall wurde publiziert in Heller *et al.*, 2002

d) Fall wurde publiziert in Kebelmann-Betzing *et al.*, 2000

e) Fall wurde publiziert in Heller *et al.*, - *in press-b*

Abkürzungen:

T-ALL	akute lymphatische Leukämie der T-Zellreihe
AML M0-M7	FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien
CML	chronisch myeloische Leukämie
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
JMML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
k.A.	keine Angaben verfügbar

oB	ohne Befund
SSW	Schwangerschaftswoche
t-AML M2	Therapieassoziierte AML M2
t-MDS RAEB	Therapieassoziiertes Myelodysplastisches Syndrom / refraktäre Anämie mit Blastenexzeß
TNF α	Tumornekrosefaktor α
V.a.	Verdacht auf

Tabelle 8.8

**MCB #8-Untersuchungen an Fällen mit Trisomie 8
(und weiteren numerischen oder strukturellen Veränderungen)**

Fall	Diagnose	Alter (in Jahren)	Karyotyp nach GTG	Zahl der analysierten MPP nach MCB #8				
				Disom	Trisom	Tetra- som	Gesamt- zahl der MPP	Struk- turelle Aberr- ation
99	AML	86	47,XX,+8[4]	0	12	0	12	n.n.
100	AML	k.A.	47,XX,+8[25]	8	16	0	24	n.n.
101	AML	14	47,XX,+8[11]/46,XX[9]	5	22	1	28	n.n.
102	AML	70	47,XY,+8[3]/46,XY[5]	9	6	0	15	n.n.
103	AML-M3	27	47,XX,+8[17]/46,XX[3]	9	40	0	49	n.n.
104	MDS	40	47,XX,+8[6]/46,XX[16]	490	172	0	662	n.n.
105	MDS	62	47,XX,+8[3]/46,XX[17]	8	2	0	10	n.n.
106	MDS- RAEBt	62	47,XX,+8[5]/46,XX[11]	58	87	0	145	n.n.
107	AML-M0	65	47,XX,+8,del(13)[9]/ 47,XX,t(4;12),+8, del(13)[9]/46,XX[2]	1	7	0	8	n.n.
108	AML	77	45-48,XY,del(1) (q?12),del(5)(q?), -7,+8,+11,-16,del(17) (p?),-19,+3mar[cp12]	2	0	12	14	n.n.
109	CML	k.A.	48,XX,+8,der(9)inv(9) (p12p13)t(9;22)(q34; q11),der(22)t(9;22), +der(22)t(9;22)[4]/ 48,XX,der(9),+15,der (22),+der(22)[9]/46, XX,der(9),der(22)[12]	228	20	0	248	n.n.
110	CML in Akzeler- ation	57	49,XY,der(9)ins(9;22) (q34;q11.2),+8, +der(9)ins(9;22) (q34;q11.2),+19[9]/ 46,XY[2]	2	9	1	12	n.n.
111	MDS- RAEBt	55	46,X,-Y,t(8;21)(q22; q22),+8[15]/46,XY[5]	42	45	0	87	t(8;21) (q22; q22)

Abkürzungen:

AML	akute myeloische Leukämie
AML M0-M7	FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien
CML	chronisch myeloische Leukämie
k.A.	keine Angaben verfügbar
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MPP	Metaphaseplatten
n.n.	nicht nachweisbar
RAEBt	refraktäre Anämie mit Blastenexzeß in Transformation

Tabelle 8.9

Fälle, bei denen nach MCB kein (eindeutiges) Ergebnis erzielt werden bzw. GTG-Bänderungs-Ergebnis nicht bestätigt werden konnte

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
Fälle mit konstitutionellen Aberrationen							
112 ^{a)}	Lymphozyten	Gesichtsdysmorphien, Blepharophimose, Balkenhypoplasie	1	46,XY,der(3)t(3;21)(q21;q22.3) <i>de-novo</i> <u>nach CGH:</u> der(3)t(3;21)(q21;q22.3) del(3)(q22q23)	#3 #21	ish t(3;21)(q21 or q23;22.3)	- del(3) konnte mit MCB nicht nachgewiesen werden - CGH wurde von Dr. H.Tönnies (Berlin) durchgeführt
113	Lymphozyten	Habituelle Aborte (4) der Ehefrau	35	46,XY,del4q → Deletion in Telomerregion von 4q bereits nachgewiesen	#4 kombiniert mit subtil 4q	ish del(4)q35.2)	→ del mit MCB alleine nicht darstellbar!
114	Lymphozyten	Statomotorische Retardierung, Aphasie, Hypokalzämie	2	46,XX,?del(10)(q26) <i>de-novo</i>	#10	ish del(10)(q26) → <i>nach MCB nicht sicher nachweisbar</i>	- del in 10q26 durch CGH bestätigt (Mitteilung von Dr. M. Volleth, Magdeburg)
115	Lymphozyten	Kompletter Atrioventrikular-Kanal-Defekt mit Pulmonalstenose	1 Monat	46,XY,?del(8)(p23.1)	#8	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	- kein Verlust der subtil 8p-Sonde - durch YACs konnte del(8)(p23.1) nachgewiesen werden, Größe der del: ca. 6Mb (mündl. Mitteilung von Dr. M. Volleth, Magdeburg)

Fortsetzung Tabelle 8.9

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
116	Lymphozyten	Pseudoxanthoma elasticum, Tuberöse Sklerose	12	46,XX?der(16p)	#16	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	
117	Lymphozyten	Craniale Dysmorphiezeichen, Ventrikelseptumdefekt	22	46,XX,?der(17) → wurde in ca. 50 % der Metaphaseplatten beschrieben	#17	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	- Hybridisierung mit LSI p53 + cep17 (ABBOTT) mit unauffälligem Ergebnis - subcen #17: keine Hinweise auf Strukturaberration

Fortsetzung Tabelle 8.9

Fall	Untersuchtes Material	Indikation bzw. klinischer Befund	Alter (in Jahren) (zum Zeitpunkt der Punktion)	Zytogenetischer Befund nach GTG	MCB-Sonde(n)	Molekularzytogenetischer Befund	Anmerkungen
Fälle mit tumorspezifischen Aberrationen							
118	Knochenmark	V.a. MDS	80	46,XY/46,XY,?der(5)	#5	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	
119	Knochenmark	Burkitt-Lymphom	40	46,XX,?der(5q), t(8;14)(q24;q32)[9] → auffällige Bänderung in 5qter?	#5	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	- subtil 5q (240G13) - YAC 827e4 (5q34) → nach Hybridisierung keine abweichende Signalkonstellation
120	Knochenmark	ALL	38	46,XX,?der(7p) → 7p vergrößert?	#7	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	
121	Knochenmark	V.a. Progreß beim Immunozytom	53	46,XX,?del(12p)	#12	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	
122	Knochenmark	V.a. AML	60	46,X,i(X)(q11.1),?der(13)	#13	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	
123	Knochenmark	AML M2 aus MDS	75	46,XX,inv(3)(q21q26)	#3	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	
124	Knochenmark	Agranulozytose	57	46,XY,?inv(3)	#3	keine Aberration mittels MCB nachweisbar	

^{a)} CGH-Ergebnis abgebildet bei Tönnies *et al.*, 2001 [entspricht Figure 2(C)]

Abkürzungen:

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AML M0-M7	FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
V.a.	Verdacht auf

Tabelle 8.10
Signalverteilung an Fällen mit Robertsonschen Translokationen

Fall	ROB	Bruchpunktanalysen mit folgenden Sonden:			
		pTRS-47	pTRS-63	pTRI-6	pU6.2
125	(13;14)	+	-	+	-
126	(13;14)	+	-	+	-
127	(13;14)	+	-	+	-
128	(13;14)	+	-	+	-
129	(13;14)	+	-	+	-
130	(13;14)	+	-	+	-
131	(13;14)	+	-	+	-
132	(13;14)	+	-	+	-
133	(13;14)	+	-	+	-
134	(13;14)	+	-	+	-
135	(13;14)	+	-	+	-
136	(13;14)	+	-	+	-
137	(13;14)	+	-	+	-
138	(13;14)	+	-	+	-
139	(13;14)	+	-	+	-
140	(13;14)	+	-	+	-
141	(13;14)	+	-	+	-
142	(14;21)	+	-	+	-
143	(14;21)	+	-	+	-
144	(14;21)	+	-	+	-
145	(14;21)	+	-	+	-

Zeichenerklärung:

- + auf den Translokationschromosomen sind Signale detektierbar
- auf den Translokationschromosomen sind keine Signale sichtbar

Tabelle 8.11

Bruchpunkte in Fällen mit tumorspezifischen Aberrationen, die bislang noch nicht in Verbindung mit hämatologischen Erkrankungen beschrieben wurden

chromosomales Rearrangement	Fall	in der Bruchregion lokalisierte Gene	ähnliche Fälle bzw. Erkrankungstypen
inv(1)(q11q31)	35	1q11: k.A. 1q31: <i>G0S8</i> , <i>IL10</i> , <i>RGS1</i> , <i>PCTK3</i>	k.A. <i>G0S8</i> Überexpression in AML, ALL und CML (in Blastenkrisen) beschrieben (Wu <i>et al.</i> , 1995)
t(1;20)(1p22.3::20p11.1)	26	1p22.2: <i>CYR61</i> , <i>LMO4</i> , <i>GNG5</i> 20p11.1: k.A.	k.A. k.A.
t(2;20)(q12;q13.2)	26	2q12: <i>IL1R1</i> , <i>IL1RL1</i> , <i>IL1RL2</i> , <i>IL1RRP</i> , <i>BCL2L11</i> , <i>IL18R</i> , <i>IL18 RAP</i> , <i>LTBP1</i> , <i>NCL</i> , <i>NCK2</i> , <i>MAP4K4</i> , <i>RANBP2</i>	k.A.
del(3)(p11q24)	75	3p11: k.A.	k.A.
i(3)(qter->p10::p10->qter)	74	3p10: k.A.	k.A.
t(3;7)(q11.1;q32)	23;24	3q11.1: k.A. 7q32: <i>IMPDH1</i> , <i>NRF1</i>	k.A. k.A.
del(3)(q12q26.1)	89	3q12: k.A.	k.A.
t(3;17)(q26.3;q12)	90	3q26.3: <i>ECT2</i> , <i>THPO</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>TNFSF10</i> , <i>RPL22</i>	k.A.
t(4;5)(p12;q11.2)	40	4p12: <i>PTTG2</i> 5q11.2: <i>LARS</i>	k.A. k.A.
der(5)t(5;?)(5q13::?)	89	5q13: <i>CCNH</i> , <i>RAF17</i>	k.A.
t(5;18)(q11;q21.3) und t(2;5)(q32;q11)	26	5q11: k.A.	k.A.
t(5;18)(q14.3;q21.3)	26	5q14.3: k.A.	k.A.
t(5;13)(p12;p10)	90	5p12: <i>GHR</i> , <i>LIFR</i> , <i>RAD1</i> , <i>FGF10</i> 13p10: k.A.	k.A. k.A.
t(5;8)(5q15 or 5q14.3::8p11.2)	26	5q15; 5q14.3: k.A. 8p11.2: <i>GPR9</i> , <i>PPP2CB</i>	k.A. k.A.
inv(7)(p21q21.3)	87	7p21: <i>IL6</i> , <i>RALA</i> 7q21.3: <i>HGF</i> , <i>ASK</i> , <i>CDK6</i>	k.A. k.A.
t(8;20)(8p23::20p11.1)	26	8p23: k.A. 20p11.1: k.A.	k.A. k.A.
t(8;18)(8q24.2-3::18p11.22)	26	8q24.2-3: <i>MYC</i> , <i>PTK2</i> , <i>PVT1</i> 18p11.22: <i>ERV1</i> , <i>YES1</i>	k.A. k.A.
r(11)(:p11.2->q13.1::q14:)	25	11p11.2: <i>HPTP eta</i> 11q13.1: <i>CCND1</i> , <i>SEA</i> , <i>CD5</i> , <i>SIPA1</i> , <i>RAD9</i> 11q14: k.A.	k.A. k.A.
t(1;13)(q21;q32)	11	13q32: <i>TNFSF13B</i> , <i>GPR18</i>	k.A.
r(13;21;21)(:13q14.2->13q33::21p11->21q22.3::21p11->21q22.??)	12	13q33: k.A. 21p11: k.A.	k.A. k.A.
del(16)(q23)	47	16q23: k.A.	k.A.
t(3;18)(q21;p11.3)	24	18p11.3: k.A.	k.A.
t(18;20)(18p11.22::20p11.1)	26	18p11.22: <i>ERV1</i> , <i>YES1</i> 20p11.1: k.A.	k.A. k.A.

Abkürzungen: ALL akute lymphatische Leukämie
 AML akute myeloische Leukämie
 CML chronisch myeloische Leukämie
 k.A. keine Angaben bislang verfügbar

9 Lebenslauf

Name:	Anita Heller
Geboren am:	07.05.1973 in Schmalkalden
Familienstand:	ledig
Adresse:	Spitzweidenweg 87, 07743 Jena
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung: 1979-1989	10-klassige Polytechnische Oberschule "Thomas-Müntzer", Fambach
Berufsausbildung: 1989-1992	Ausbildung als Medizinisch-technische Laborassistentin an der Medizinischen Fachschule "Semmelpreis", Meiningen (Erlangung der Hochschulzugangsberechtigung)
Hochschulausbildung: 1992-1998	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Medizinische Mikrobiologie, Pharmakologie, Botanik
1997-1998	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena mit dem Thema: "Differenzierung komplexer Karyotypveränderungen bei malignen hämatologischen Erkrankungen mittels vergleichender Genomhybridisierung"
April 1998 ab Oktober 1999	Erlangung des akademischen Grades der Diplom-Biologin Promotionsstudentin am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Wissenschaftliche Laufbahn: März-Dezember 1998, April-Juni 2000	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena
01.10.1998-30.09.1999	Stipendiatin der Herbert Quandt Stiftung der Varta AG
01.04.1999-31.03.2000	Stipendiatin der Madeleine Schickedanz-Kinderkrebsstiftung
01.07.2000-30.05.2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines von der Wilhelm-Sander-Stiftung geförderten Projektes Thema: „Identifizierung und Charakterisierung kryptischer chromosomaler Rearrangements bei myeloischen Leukämien mittels <i>High-resolution-multicolor-banding</i> (MCB)“
Okt. – Dez. 2001	Forschungsaufenthalt am Baylor College of Medicine bei Prof. Dr. Lisa G Shaffer, Department of Molecular and Human Genetics in Houston, Texas, USA, gefördert durch Boehringer Ingelheim Fonds
Jena, den 25.02.04	

10 Publikationsliste

Publikationen

- P1. Starke H, Schreyer I, Fiedler W, Beensen V, *Heller A*, Nietzel A, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of a prenatally detected supernumerary minute marker chromosome 8. *Prenatal Diagn* 1999, Vol 19, pp 1169-1174.
- P2. *Heller A*, Chudoba I, Bleck C, Senger G, Claussen U, Liehr T. Microdissection based comparative genomic hybridization (*Micro-CGH*) analysis of secondary acute myelogenous leukemias. *Int J Onc* 2000, Vol 16, pp 461-468.
- P3. Hübler A, Seidel J, Kauf E, Schramm D, Beensen V, *Heller A*, Liehr T, Zintl F. Insulin-like growth factor serum concentrations reflect insufficient growth in a hypoplastic infant with partial trisomy 9q in the 12th week of life. *J. of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 2000 Vol 13; 445-450.
- P4. *Heller A*, Seidel J, Hübler A, Starke H, Beensen V., Senger G, Rocchi M, Wirth J, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of partial trisomy 9q in a case with pyloric stenosis and a review of the literature. *J Med Genet*, 2000, Vol 37, pp 529-532.
- P5. Nietzel A, Rocchi M, Starke H, *Heller A*, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T. A new multicolor-FISH approach for the characterizations of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet*, 2000, Vol 108, pp 199-204.
- P6. Kebelmann-Betzing C, Seeger K, Kulozik A, Henze G, Liehr T, *Heller A*, Teigler-Schlegel A. Secondary acute myeloid leukemia after treatment of acute monoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2000, Vol 343, pp 1897-1898.
- P7. Yu YX, *Heller A*, Liehr T, Aurelian L. Expression analysis and chromosome location of a novel gene (H11) associated with the growth of human melanoma cells. *Int J Onc* 2001, Vol. 18, pp 905-911.
- P8. Starke H, Raida M, Trifonov V, Clement JH, Loncarevic IF, *Heller A*, Bleck C, Nietzel A, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of an acquired supernumerary minute marker chromosome as sole abnormality in a case clinically diagnosed as Philadelphia negative chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol* 2001, Vol 113, pp 435-438.
- P9. Bleichert A, Fiedler W, Claussen U, Ernst G, Loncarevic IF, *Heller A*, Liehr T, Kunert C, von Eggeling F. A long distance-PCR derived FISH probe detects a deletion between p15 and p16 in CML and T-ALL patients. *Int J Mol Med* 2001, Vol. 7, pp591-595
- P10. Alves G, *Heller A*, Fiedler W, Mendes Campos M, Claussen U, Ornellas AA, Liehr T. Genetic imbalances in 26 PENILE SCC cases. *Genes Chr Cancer* 2001, Vol 31, pp 48-53.
- P11. Liehr T, Beensen V, Hauschild R, Ziegler M, Hartmann I, Starke H, *Heller A*, Kähler C, Schmidt M, Reiber W, Hesse M, Claussen U. Pitfalls of rapid prenatal diagnosis using the inter-phase nucleus. *Prenat Diagn*, 2001, Vol 21, pp 419-421.
- P12. Liehr T, *Heller A*, Starke H, Claussen U. High-quality CGH slides irrespective of the lymphocyte suspension used. *Technical Tips Online*, <http://research.bmn.com/>
- P13. Mrasek K, *Heller A*, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Rocchi M, Claussen U, Liehr T. Reconstruction of the female *Gorilla gorilla* karyotype by Zoo-FISH using 25-color FISH and multi-color banding (MCB). *Cytogenet Cell Genet* 2001, Vol. 93, pp 242-248.

- P14. Starke H, Senger G, Kossakiewicz M, Tittelbach H, Rau D, Rubtsov N, Trifonov V, *Heller A*, Hartmann I, Claussen U, Liehr T. Maternal insertion of 18q11.2-q12.2 in 18p11.3 of the same chromosome analysed by microdissection and multicolour banding (MCB). *Prenat Diag* 2001, Vol. 21, pp 1049-1052.
- P15. Weise A, Starke H, *Heller A*, Claussen U, Liehr T. Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis – a multicolor banding (MCB) analysis. *Int J Mol Med* 2002, Vol 9, pp 359-361.
- P16. Liehr T, *Heller A*, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. Microdissection based high resolution multicolor banding (MCB) for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002, Vol 9, pp 335-339.
- P17. Liehr T, Schmidt M, Starke H, Ziegler M, Kittner G, *Heller A*, Rubtsov N, Trifonov V, Claussen U. First case of trisomy 13 plus mosaic trisomy 1q. *Fet Diag Ther* 2002, Vol. 17, pp133-136.
- P18. Loncarevic IF, Römer J, Starke H, *Heller A*, Bleck C, Ziegler M, Fiedler W, Liehr T, Clement JH, Claussen U. Heterogenic molecular basis for loss of ABL1-BCR transcription: Deletions in der(9)t(9;22) and variants of standard t(9;22) in BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. *Genes Chr Cancer* 2002, Vol. 34, pp 193-200.
- P19. *Heller A*, Starke H, Trifonov V, Rubtsov N, Wedding U, Loncarevic IF, Bleck C, Claussen U, Liehr T. A complex translocation event between the two homologues of chromosomes 5 leading to a del(5)(q21q33) as a sole aberration in a case clinically diagnosed as CML - characterization of the aberration by multicolor banding (MCB). *In J Onc* 2002, Vol. 20, pp 1179-1181.
- P20. Weise A, Starke H, *Heller A*, Tönnies H, Volleth M, Stumm M, Senger G, Nietzel A, Claussen U, Liehr T. Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterized by high resolution multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes. *J Med Genet* 2002, Vol 39, pp 434-439.
- P21. Liehr T, Schreyer I, Neumann A, Beensen V, Ziegler M, Hartmann I, Starke H, *Heller A*, Nietzel A, Claussen U. Two more possible pitfalls of rapid prenatal diagnostics using interphase nuclei. *Prenat Diagn* 2002, Vol. 22, pp 497-499.
- P22. Bandyopadhyay R, *Heller A*, Knox-DuBois C, McCaskill C, Berend SA, Page SL, Shaffer LG. Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet* 2002; Vol. 71, pp 1456-1462.
- P23. Liehr T, Weise A, *Heller A*, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Weier HU, Claussen U. Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res* 2002, Vol. 97, pp 43-50.
- P 24. Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, *Heller A*, Claussen U, Liehr T. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet* 2002, Vol. 10, pp 790-800.
- P25. Starke H, Mitulla B, Nietzel A, *Heller A*, Beensen V, Grosswendt G, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. First patient with trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(:p11 --> q11:) plus partial uniparental disomy 4p15-16. *Am J Med Genet* 2003, Vol. 116, pp 26-30.
- P 26. Nietzel A, Albrecht B, Starke H, *Heller A*, Gillesen-Kaesbach G, Claussen U, Liehr T. Partial hexasomy 15pter-->15q13 including *SNRPN* and D15S10: first molecular cytogenetically proven case report. *J Med Genet* 2003, Vol. 40, e28.
- P27. Liehr T, Starke H, *Heller A*, Weise A, Beensen V, Senger G, Kittner G, Prectel M, Claussen U, Seidel J. Evidence for a new microdeletion syndrome in 15q21. *Int J Mol Med* 2003, Vol. 11, pp 575-577.

- P28. Trifonov V, Seidel J, Starke H, Martina P, Beensen V, Ziegler M, Hartmann I, *Heller A*, Nietzel A, Claussen U, Liehr T. Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. *Prenat Diagn* 2003, Vol. 23, pp 427-430.
- P30. *Heller A*, Rubtsov N, Kytola S, Karamysheva TV, Sablina OV, Degtyareva MM, Starke H, Metzke H, Claussen U, Liehr T. Highly complex karyotypic changes in acute myelogenous leukemia: a case report. *Int J Oncol* 2003, Vol. 23, pp 139-143.
- P31. Mrasek K, *Heller A*, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Claussen U, Liehr T. Detailed *Hylobates lar* karyotype defined by 25-color FISH and multicolor banding (MCB). *Int J Mol Med*. Vol 12, pp 139-46.
- P32. Seidel J, *Heller A*, Senger G, Starke H, Chudoba I, Kelbova C, Tönnies H, Neitzel H, Haase C, Beensen V, Zintl F, Claussen U, Liehr T. A multiple translocation event in a patient with hexadactyly, facial dysmorphism, mental retardation and behavior disorder characterized comprehensively by molecular cytogenetics – Case report and review of the literature. *Eur J Pediatr*. 162: 582-588
- P33. Liehr T, Ziegler M, Starke H, *Heller A*, Küchler A, Kittner G, Beensen V, Seidel J, Häßler H, Müsebeck J, Claussen U. Conspicuous GTG banding results of the centromere near region can be caused by alphoid DNA heteromorphism. *Clinical Genet*. Vol 64, pp 166-167.
- P34. Starke H, Mitulla B, Beensen V, Trifonov V, Rubtsov N, *Heller A*, Ziegler M, Neumann A, Claussen U, Liehr T. First postnatal case of mosaic del(22)/r(22). *Prenat Diagn*. *in press*
- P35. *Heller A*, Brecevic L, Glaser M, Loncarevic IF, Gebhart E, Claussen U, Liehr T. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a comprehensive molecular cytogenetic analysis reveals no cryptic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet*. *in press*
- P36. *Heller A*, Trifonov V, Rubtsov N, Sauerbrey A, Starke H, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T. Complex chromosomal rearrangements in a secondary acute myeloblastic leukemia after chemotherapy in TRAPS. *Int J Onc*. *in press*
- P37. *Heller A*, Fricke HJ, Starke H, Loncarevic IF, Claussen U, Liehr T. Characterization of a highly aberrant plasma cell leukemia karyotype: a case report. *Oncology reports*. *in press*
- P38. *Heller A*, Loncarevic IF, Glaser M, Gebhart E, Trautmann U, Claussen U, Liehr T. Breakpoint differentiation in chromosomal aberrations of hematological malignancies – Identification of 33 previously unrecorded breakpoints. *Int J Onc*. *submitted*
- P39. Starke H, Nietzel A, Weise A, *Heller A*, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Küchler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F, Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (SMC): genotype – phenotype correlation and classification. *Hum Genet*. *in press*
- P40. Zumkeller W, Volleth M, Muschke P, Tönnies H, *Heller A*, Liehr T, Wieacker P, Stumm M. Genotype / phenotype analysis in a patient with pure and complete trisomy 12p. *J Med Genet*. *submitted*

review

- T Liehr, A Heller, H Starke, U Claussen. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) banding methods - applications in research and diagnostic. Expert Review of Molecular Diagnostics 2002, Vol 2, pp 217-225.

Buchbeiträge

- A Nietzel, A Heller, H Starke, T Liehr. Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). In: FISH-Technology, Springer-labmanual, Springer, Berlin, 2002, pp 425-431, ISBN: 3-540-67276-1.

- T Liehr, A Nietzel, M Rocchi, A Heller, H Starke, U Claussen, F v Eggeling. Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) followed by analysis for uniparental disomy - a useful tool in prenatal diagnosis. In: Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother - present state and perspectives. The Karolinum Press, Prag, 2002, pp 293-300, ISBN: 80-246-0397-7.

Kongressbeiträge

K1. *Heller A*, Chudoba I, Claussen U. Differenzierung komplexer Karyotypveränderungen bei malignen hämatologischen Erkrankungen mittels comparative genomic hybridization (CGH). Abstractband der 10. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung, 22.-24.Mai 1997. (Vortrag)

K2. Chudoba I, Stauch M, Senger G, *Heller A*, Bleck C, Claussen U. Ist der Verlust von 18p eine typische Aberration bei Polycythämia vera?. Abstractband der 10. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung, 22.-24.Mai 1997.

K3. *Heller A*; Chudoba I; Haas OA, Claussen U. Partial trisomy 3q detected by comparative genomic hybridization (CGH) in juvenile myelomonocytic leukemia. Med Genetik 1998; Vol 10, p 129 (Abstractnr. P2B-4).

K4. *Heller A*, Starke H, Seidel J, Beensen V, Senger G, Rocchi M, Wirth J, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of a partial trisomy 9q to narrow down a putative critical region of a gene responsible for pyloric stenosis. Med Genetik 1999; Vol 11, p 166 (Abstractnr. P4-19).

K5. Liehr T, *Heller A*, Starke H, Wirth J, Senger G, Chudoba I, Rocchi M, Weier H-U, Claussen U. High resolution multicolor banding (hrM-FISH) for human chromosome 13 using YAC libraries as probes. Med Genetik 1999; Vol 11, p 132 (Abstractnr. W11-4).

K6. Nietzel A, Starke H, *Heller A*, Senger G, Claussen U, Liehr T. Centromere specific 24-color-FISH - a new approach for the characterization of marker chromosomes. Med Genetik 1999; Vol 11, p 132-133 (Abstractnr. W11-6).

K7. Starke H, Schreyer I, Fiedler W, Beensen V, *Heller A*, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Alternative strategy for the molecular characterization of small marker chromosomes in prenatal cases. Med Genetik 1999; Vol 11, p 174 (Abstractnr. P4-56).

K8. *Heller A*, Starke H, Ziegler M, Loncarevic I F, Claussen U, Liehr T. Ist der Ausschluß eines Sub-Klones mit numerischen Veränderungen der Chromosomen 7 und/oder 8 mittels FISH bei der ALL von Relevanz? Abstractband der 12. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung, 27.-29.Mai 1999. (Vortrag)

K9. Starke H, *Heller A*, Ziegler M, Loncarvic I F, Claussen U, Gebhart E, Liehr T. Eine neue Dreifarbf-FISH-Methode zur Verlaufskontrolle Ph-positiver CML-Fälle nach gegengeschlechtlicher KMT. Abstractband der 12. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung, 27.-29.Mai 1999.

K10. Liehr T, Starke H, Loncarvic I F, *Heller A*, Ziegler M, Claussen U. Einsatz der p53 FISH-Sonde zur Prognosedifferenzierung bei Leukämien. Abstractband der 12. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung, 27.-29.Mai 1999.

K11 Liehr T, Starke H, *Heller A*, Wirth J, Senger G, Chudoba I, Rocchi M, Claussen U. Multicolor banding (MCB) of human chromosome 13 based on region specific YAC clones and microdissection libraries. Cytogenet Cell Genet 1999; Vol 85: p 30 (Abstractnr. O 099).

K12. Nietzel A, Starke H, *Heller A*, Fiedler W, Senger G, Gebhart E, Rocchi M, Claussen U, Liehr T. Characterization of small marker chromosomes by centromere specific 24-color FISH. Cytogenet Cell Genet 1999; Vol 85: p 40 (Abstractnr. P 142).

K13. *Heller A*, Starke H, Loncarevic IF, Senger G, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Characterization of a highly aberrant plasmocytoma case with 24-color FISH, CGH, multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes. Cytogenet Cell Genet 1999; Vol 85: p 72 (Abstractnr. P 280).

K14. Starke H, *Heller A*, Seidel J, Beensen V, Senger G, Stumm M, Wirth J, Kearney L, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of the region 2q37 in patients suffering from brachydactyly E. Cytogenet Cell Genet 1999; Vol 85: p 166 (Abstractnr. P 704).

- K15. Starke H, Rump A, Seidel J, Beensen V, Stumm M, Wirth J, *Heller A*, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of the chromosomal region 2q37 in patients suffering from brachydactyly E including probes for the putative candidate gene LOBO1. *Am J Hum Genet* 1999, Vol 65, p A358 (Abstractnr. 2023).
- K16. *Heller A*, Starke H, Loncarevic IF, Senger G, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterization of a highly aberrant plasmocytoma case with 24-color FISH, CGH, multi-color banding (MCB) and region specific FISH probes. *Am J Hum Genet* 1999, Vol 65, p A130 (Abstractnr. 695).
- K17. Liehr T, *Heller A*, Starke H, Lemke J, Wirth J, Senger G, Chudoba I, Rocchi M, Claussen U. Multicolor banding (MCB) of human chromosomes 1, 5 and 13 based on region specific YAC clones and microdissection libraries. *Am J Hum Genet* 1999, Vol 65, p A9 (Abstractnr. 39).
- K18. N Rubtsov, T Karamysheva, T Babochkina, N Zhdanova, V Trifonov, H Starke, *A Heller*, K Junker, T Liehr, U Claussen. A new simple version of chromosome microdissection tested by probe generation for 24-multi-color FISH, multi-color banding (MCB), ZOO-FISH and in clinical diagnostics. *Med Genetik* 2000; Vol 12, p 65 (Abstractnr. W12-4).
- K19. A Nietzel, I Wlodarska, *A Heller*, H Starke, E Gebhart, B Rautenstrauss, M Rocchi, A Hagemeyer, U Claussen, T Liehr. Amplification of centromeric satellite DNA in marker chromosomes with homogeneously staining regions (HSR) identified by centromere-specific 24-color FISH. *Med Genetik* 2000; Vol 12, p 61 (Abstractnr. W9-5).
- K20. *A Heller*, H Starke, V Trifonov, N Rubtsov, J Lemke, J Wirth, G Senger, I Chudoba, M Rocchi, U Claussen, T Liehr. Multicolor banding (MCB) of human chromosomes based on region specific YAC clones and/or microdissection libraries. *Med Genetik* 2000; Vol 12, p 92 (Abstractnr. P-I-2.3).
- K21. M Ziegler, A Schmidt, A Nietzel, H Starke, *A Heller*, G Senger, U Claussen, T Liehr. Identification and molecular characterization of a prenatally detected maternally inherited supernumerary small ring chromosome 8p. *Med Genetik* 2000; Vol 12, p 100 (Abstractnr. P-I-4.6).
- K22. I Schreyer, V Beensen, KH Eichhorn, *A Heller*, T Liehr, E Schulze, H Starke, U Claussen. Detection of a small unbalanced 1/17 translocation in a mentally retarded and dysmorphic child via chromosome analysis of the parents. *Med Genetik* 2000; Vol 12, p 101-102 (Abstractnr. P-I-4.13).
- K23. T Liehr, A Nietzel, *A Heller*, H Starke, V Trifonov, M Rocchi, W Fiedler, U Claussen. A new M-FISH technique: centromere specific 24-color FISH (cenM-FISH). *Proceedings of the First Euroconference on quantitative molecular cytogenetics, Italien, Bari, 13-15.04.2000*, pp 36-38.
- K24. M Stumm, S Kleindorff, M Volleth, G Bollmann, *A Heller*, T Liehr, S Neubauer. The quantification of spontaneous and radiation induced chromosomal aberrations by three color FISH. *Proceedings of the First Euroconference on quantitative molecular cytogenetics, Italien, Bari, 13-15.04.2000*, pp 28-31.
- K25. IF Loncarevic, H Starke, *A Heller*, C Bleck, M Ziegler, W Fiedler, T Liehr, HJ Clement, C Kelbova, U Claussen. BCR-ABL positive but ABL-BCR negative chronic myeloid leukemia (CML) result from a deletion in chromosome der(9)t(9;22) and from BCR-ABL formation by gene insertion. *Onkologie* 2000, Vol 23/S7, p134, Abstractnr. 0508.
- K26. H Starke, M Rocchi, H-U Weier, *A Heller*, R Niemann, RA Pfeiffer, U Claussen, T Liehr. Multicolor banding (MCB) of human chromosome 22 - application of the probe mix for the characterization of "cat eye chromosome" inv dup(22)(q11). *Europ J Hum Genet*, 2000, Vol 8 Suppl 1, p 87 (Abstractnr. P-295).
- K27. *A Heller*, A Nietzel, M Rocchi, W Fiedler, H Starke, U Claussen, T Liehr. Centromere specific multi-color FISH (cenM-FISH) - a new and rapid method for the identification of marker chromosomes. *Europ J Hum Genet*, 2000, Vol 8 Suppl 1, p 87 (Abstractnr. P-294).

- K28. A Heller, A Nietzel, M Rocchi, H Starke, W Fiedler, U Claussen, T Liehr. The identification of marker chromosomes with a new multi-color FISH technique specific for centromeres. *Cell Mol Biol* 2000, Vol 46, Abstractnr. 90.
- K29. K Mrasek, A Heller, H Starke, V Trifonov, N Rubtsov, U Wedding, I Loncarevic, C Bleck, U Claussen, T Liehr. Complex translocation between the two homologue chromosomes 5 in CML - characterization of the aberration by multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p132, Abstractnr. P0164.
- K30. A Heller, N Rubtsov, V Trifonov, H Starke, IF Loncarevic, U Claussen, T Liehr. Characterization of complex aberrant leukemia cases by means of multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, pp133-134, Abstractnr. P0171.
- K31. A Küchler, S Michel, B Pool-Zobel, A Schäferhenrich, A Heller, H Starke, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen, T Liehr. Characterization of the colon cell line HT29 clone 19A by means of GTG-banding, 24-color FISH and multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p138, Abstractnr. P0193.
- K32. T Liehr, A Heller, H Starke, A Weise, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Multicolor banding (MCB) of all human chromosomes based on region specific microdissection libraries. *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p138, Abstractnr. P0207.
- K33. V Beensen, T Liehr, A Heller, H Starke, M Wiederhold, P Mühlig, P Ullmann. Ultrastructure analyses on human chromosomes in the interphase and mitosis of the cell cycle with the laser scanning microscop LSM 510. *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, pp141-142, Abstractnr. P0209.
- K34. A Weise, H Starke, M Volleth, M Stumm, A Heller, N Rubtsov, V Trifonov, M Rocchi, K Mrasek, U Claussen, T Liehr. Chromosome 2 rearrangements precisely characterized by multicolor banding (MCB) and simultaneously with region specific probes. *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p142, Abstractnr. P0212.
- K35. U Claussen, J Lemke, J Claussen, I Chudoba, V Trifonov, N Rubtsov, H Starke, A Heller, K Sperling, T Liehr. Chromosomes in interphase are similar to metaphase chromosomes. *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p144, Abstractnr. P0221.
- K36. H Starke, G Senger, M Kossakiewicz, H Tittelbach, N Rubtsov, V Trifonov, A Heller, U Claussen, T Liehr. Maternal insertion of 18q11.2-q12.2 in 18p11.3 leading to recurrent unbalanced translocations in the offspring detected by microdissection and multicolor banding (MCB). *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p152, Abstractnr. P0265.
- K37. I Hartmann, H Starke, A Nietzel, F Von Eggeling, A Heller, M Rocchi, V Beensen, B Mitulla, U Claussen, T Liehr. Characterization of a small supernumerary marker chromosome by centromere specific multicolor-color FISH (cenM-FISH): case report. *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p142, Abstractnr. P0210.
- K38. R Hauschild, V Beensen, A Heller, H Starke, T Liehr. Suspicion on triple - X - syndrome in rapid prenatal FISH diagnosis on uncultivated amniotic fluid cells: Problems and pitfalls for genetic counselling. *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1 pp255-256, Abstractnr. P0800.
- K39. (o) U Claussen, J Lemke, J Claussen, A Heller, H Starke, V Trifonov, N Rubtsov, K Sperling, T Liehr. Chromosome dynamics in vivo. *Ann Genet* 2001, Vol 44/S1, p17.
- K40. (Posterpreis) K Mrasek, A Heller, H Starke, M Rocchi, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen, T Liehr. Human multicolor banding (MCB) probes applied for ZOO-FISH in Gorilla gorilla. *Ann Genet* 2001, Vol 44/S1, p33, Abstractnr. 1-035.
- K41. A Heller, N Rubtsov, V Trifonov, H Starke, IF Loncarevic, U Claussen, T Liehr. Characterization of complex aberrant leukemias by means of multicolor banding (MCB). *Ann Genet* 2001, Vol 44/S1, p112, Abstractnr. 2-384.

- K42. T Liehr, A Heller, H Starke, A Weise, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Multicolor banding (MCB) of all human chromosomes using region specific midi libraries. Ann Genet 2001, Vol 44/S1, p161, Abstractnr. 3-601.
- K43. A Weise, H Starke, M Rocchi, A Heller, U Claussen, T Liehr. Chromosome 2 Rearrangements characterized by MCB combined with region specific probes. Ann Genet 2001, Vol 44/S1, p69, Abstractnr. 1-178.
- K44. H Starke, A Nietzel, F von Eggeling, A Heller, M Rocchi, V Beensen, U Claussen, T Liehr. Characterization of a small SMC by centromere specific multicolor FISH (cenM-FISH). Ann Genet 2001, Vol 44/S1, p161, Abstractnr. 3-600.
- K45. (o) U Claussen, J Lemke, J Claussen, S Michel, A Heller, H Starke, V Trifonov, N Rubtsov, K Sperling, T Liehr. Chromosomal bands in interphase nuclei. Chromosome Research 2001, Vol9/S1, p1, Abstractnr. L8.
- K46. A Heller, K Mrasek, N Rubtsov, V Trifonov, H Starke, M Rocchi, U Claussen, T Liehr. Reconstruction of the female *Gorilla gorilla* karyotype by ZOO-FISH using 25-colour FISH and multicolour banding (MCB). Chromosome Research 2001, Vol9/S1, p68, Abstractnr P16.
- K47. T Liehr, A Heller, H Starke, A Weise, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Application of the complete human multicolor banding (MCB) set in cancer and clinical cytogenetics. Am J Hum Genet 2001, Vol 69/S1, p335, Abstractnr 895.
- K48. A Heller, K Mrasek, M Rocchi, V Trifonov, N Rubtsov, H Starke, U Claussen, T Liehr. Human multicolor banding (MCB) probes applied for ZOO-FISH in *Gorilla gorilla* and *Hylobates lar*. Am J Hum Genet 2001, Vol 69/S1, p323, Abstractnr 821.
- K49. U Claussen, J Lemke, J Claussen, I Chudoba, V Trifonov, N Rubtsov, A Heller, H Starke, K Sperling, T Liehr. The shape and DNA mediated banding pattern of chromosomes in interphase are similar to metaphase chromosomes. Am J Hum Genet 2001, Vol 69/S1, p314, Abstractnr 766.
- K50. (o) T Liehr, A Heller, H Starke, A Weise, K Mrasek, V Trifonov, N Rubtsov, U Claussen. Multicolor banding (MCB) - a versatile tool for characterization of exact chromosomal breakpoints. Abstracts of the HGM2002 (Human Genome Meeting) 14.-17.04.2002, Schanghai, China, p 63, Abstractnr. 80.
- K51. A Weise, H Starke, A Heller, U Claussen, T Liehr. Reexamination of chromosome 2 rearrangements characterized by multicolor banding (MCB) by region-specific FISH probes Europ J Hum Genet 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 94; Abstractnr P0097.
- K52. A Kuechler, A Weise, S Michel, B Pool-Zobel, A Schaeferhenrich, A Heller, H Starke, TG Wendt, U Claussen, T Liehr. Precise characterization of chromosomal rearrangements of the colon cancer cell line HT29 clone 19A by multicolor banding (MCB). Europ J Hum Genet 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 87; Abstractnr P0064.
- K53. (o) H Starke, A Weise, A Nietzel, A Heller, U Claussen, T Liehr. A new probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. Europ J Hum Genet 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 147; Abstractnr P0346.
- K54. A Heller, B Albrecht, A Nietzel, H Starke, F von Eggeling, U Claussen, T Liehr. Characterization of two small supernumerary marker chromosomes (SMC) by acro/cenM-FISH – first case with partial hexasomy 15pter→15q13. Europ J Hum Genet 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 146; Abstractnr P0342.

- K55. (o) T Liehr, A Nietzel, H Starke, A *Heller*, A Weise, K Mrasek, U Claussen. Straight-forward characterization of small human marker-chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH), high resolution multicolor banding (MCB) and analysis for uniparental disomy (UPD). The Scand J Clin And Lab Investig 2002, Vol. 62 Supp 236, pp 19-20.
- K56. (o) T Liehr, A Nietzel, M Oliver Bonet, H Starke, A *Heller*, A Weise, F v Eggeling, U Claussen. Characterization of human small marker-chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). Med Genetik 2002; Vol 14, p 253; Abstractnr W2-03.
- K57. (o) H Starke, A *Heller*, A Weise, A Nietzel, U Claussen, T Liehr. A new subcentromeric probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. Med Genetik 2002; Vol 14, p 262; Abstractnr W11-04.
- K58. I Schreyer, V Beensen, KH Eichhorn, A *Heller*, T Liehr, U Claussen. Dup(13)(q14.2q21.1) – yet another differential diagnostic aspect for short stature like phenotype. Med Genetik 2002, Vol. 14, p 286; Abstractnr P1-04 19.
- K59. (o) H Starke, V Trifonov, J Seidel, V Beensen, A *Heller*, U Claussen, T Liehr. Enlarged chromosome 13 p-arm hiding a cryptic partial trisomy 6p22.2-pter. Europ J Hum Genet 2003, Vol 11 Suppl 1, p 297; Abstractnr. P297.

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zytogenetik“ angefertigt und wäre ohne die Hilfe vieler Menschen nicht in dieser Form möglich gewesen.

Ich möchte all denen herzlich danken, die mich während dieser Zeit unterstützt und motiviert haben.

Besonderen Dank schulde ich Dr. Thomas Liehr für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und ununterbrochene Unterstützung während dieser Arbeit, für wertvolle Ratschläge und die Durchsicht des Manuskriptes.

Prof. Dr. Uwe Claussen danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena, anfertigen zu können, das Interesse an meiner Arbeit, seine rege Diskussionsbereitschaft sowie die Durchsicht des Manuskriptes.

Allen „FISHern“ herzlichen Dank für die gute Zusammenarbeit, die Anteilnahme an meiner Arbeit, die praktische Unterstützung und nicht zu vergessen: die Energie-liefernde Atmosphäre der Frühstücksrunde. Namentlich (in alphabetischer Reihenfolge) möchte ich mich bedanken bei: Isabell Hartmann, Constanze Karst, Dr. Alma Küchler, Angela Nietzel, Heike Starke, Anja Weise und Monika Ziegler.

Weiterhin danke ich Dr. Vladimir Trifonov und Dr. Nikolai Rubtsov für deren engagierten Einsatz beim Herstellen der Mikrosezierungsbanken, Kristin Mrasek für ihre zielstrebige und erfolgreiche Bearbeitung der Primatenzelllinien sowie Dr. Lukrecija Brecevic und Melanie Glaser für ihre Unterstützung bei Analyse der Trisomie 8-Fälle.

Ebenso gilt mein Dank allen – auch ehemaligen – Mitarbeitern und Gästen des Institutes für Humangenetik und Anthropologie, die mich durch Bereitstellung von Zellsuspensionen und DNA-Sonden, Einarbeitung in neue Methoden, Diskussionen und ihre Sympathie unterstützt haben.

Dankbar bin ich auch Dr. Ivan F. Loncarevic für dessen kritische Sicht der Dinge, seine Motivation und wertvollen Tips bezüglich des Manuskriptes.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Herbert Quandt Stiftung der Varta-AG, der Madeleine Schickedanz-Kinderkrebsstiftung, der Wilhelm-Sander-Stiftung sowie bei Boehringer Ingelheim Fonds.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Lisa G. Shaffer und ihren Mitarbeitern am Baylor College of Medicine in Houston für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und Betreuung im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden für deren immerwährende geduldige moralische Unterstützung und Anteilnahme an meinem Tun.

Allen externen Einsendern (im folgenden alphabetisch aufgelistet) von Proben und Zellmaterial möchte ich hiermit danken:

- Dr. Britta Belitz, Praxis für Medizinische Genetik, Berlin
- Andrea Bier, Genetische Beratung, Institut für klinische Genetik, Dresden
- Dipl.-Biol. Anette Dermitzel, Labor für Humangenetik, Pränataldiagnostik, Peine
- Dr. Andreas Dufke, Institut für Humangenetik, Abt. Medizinische Genetik, Tübingen
- Prof. Dr. Erich Gebhart, Institut für Humangenetik, Friedrich-Alexander-Universität Nürnberg-Erlangen
- Dr. G. Gillessen-Kaesbach, Institut für Humangenetik, Universitäts-Klinikum, Essen
- Dr. Jürgen Götz, Partnerschaft, Humangenetische Beratung und Diagnostik, Wetzlar
- Prof. Dr. Oskar Haas, St. Anna Kinderspital, Wien
- Prof. Dr. Ingo Hansmann, Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Halle
- Dr. Gabriele Hickmann, Praxis für Pränatal-Medizin und Genetik, Düsseldorf
- Dr. Annelore Junge, Praxis für Medizinische Genetik, Dresden
- Prof. Dr. E. Kauf, Kinderklinik der FSU, Jena
- Dr. Christina Kelbova, Praxis Dr. Küpferling, Cottbus
- Dr. Christian Kebelmann-Betzing, Charité Campus, Berlin
- OA. Dr. H.G. Sayer der Mildred-Scheel-Station für Knochenmarktransplantation der Klinik für Innere Medizin der FSU, Jena
- OA Dr. Jörg Seidel, Kinderklinik der FSU, Jena
- Dr. Martina Stauch, Hämatologie und internistische Onkologie, Kronach
- Dr. Markus Stumm, Praxis für Ultraschall und Humangenetik, Berlin
- Dr. Hanne Tittelbach, Gemeinschaftspraxis Dr. Kossakiewicz, Nürnberg
- Dr. Holger Tönnies, Institut für Humangenetik, Charité Campus, Berlin
- Dr. Marianne Volleth, Institut für Humangenetik, Universitäts-Klinikum, Magdeburg
- OA Dr. U. Wedding der Poliklinik für Hämatologie und Station 9, Klinik für Innere Medizin der FSU, Jena
- Prof. Dr. Rolf-Dieter Wegner, Praxis für Ultraschall und Humangenetik, Berlin.

12 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angegeben habe.

Jena, den 25.02.04